

Università degli Studi di Pisa

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

**Corso di Laurea Specialistica in Scienze Fisiopatologiche
Generali**



***Espressione, localizzazione e accoppiamento
funzionale del recettore 2 della somatostatina in un
modello di retinopatia indotta da ossigeno.***

Candidato

Noemi Lo Re

Relatore

Dott. Massimo Dal Monte

Anno Accademico 2008/09

Alla mia famiglia

Indice

Riassunto.....	1
Abstract.....	4
INTRODUZIONE.....	6
<u>CAPITOLO 1: La retina.....</u>	<u>6</u>
<i>1.1 Caratteristiche retiniche.....</i>	<i>6</i>
<i>1.2 Apporto ematico retinico.....</i>	<i>9</i>
<i>1.3 Barriera emato-retinica.....</i>	<i>11</i>
<i>1.4 Patologie retiniche derivate da neovascolarizzazione.....</i>	<i>12</i>
<i>1.4.1 Retinopatia del prematuro (ROP).....</i>	<i>12</i>
<i>1.4.2 Retinopatia diabetica (DR).....</i>	<i>16</i>
<i>1.4.3 Degenerazione maculare senile (AMD).....</i>	<i>19</i>
<u>CAPITOLO 2: Neovascolarizzazione e angiogenesi.....</u>	<u>21</u>
<u>CAPITOLO 3: Il VEGF.....</u>	<u>24</u>
<i>3.1 Regolazione dell'espressione del VEGF durante l'angiogenesi nella retina.....</i>	<i>25</i>

<i>3.2 I recettori del VEGF</i>	26
<i>3.3 Trasduzione del segnale attraverso i VEGFRs</i>	27
<i>3.3.1 VEGFR-1</i>	27
<i>3.3.2 VEGFR-2</i>	28
<i>3.3.3 VEGFR-3</i>	29
<i>3.4 VEGF e recettori durante lo sviluppo</i>	30
<i>3.5 VEGF e recettori nell'adulto</i>	31
<i>3.6 Il VEGF e i suoi recettori nella retina in condizioni fisiologiche</i>	32
<i>3.7 Il VEGF e i suoi recettori nella retina in condizioni patologiche</i>	33
<i>3.7.1 Il VEGF nellaROP</i>	33
<i>3.7.2 Il VEGF nella PDR</i>	35
<i>3.7.3 Il VEGF nell'AMD</i>	36
 <u>CAPITOLO 4: Terapie anti-angiogeniche</u>	39
<i>4.1 Terapie fisiche</i>	39
<i>4.1.1 Termoterapia laser con ablazione transpupillare dei vasi (TTT)</i>	39
<i>4.1.2 Fotocoagulazione laser</i>	40
<i>4.1.3 Terapia fotodinamica con verteporfina (PDT)</i>	40

4.1.4 Vitreotomia	41
4.2 Terapie farmacologiche ,.....	41
 <u>CAPITOLO 5: La somatostatina</u>	44
5.1 La somatostatina e le sue funzioni	44
5.2 Famiglia dei recettori della Somatostatina (SST)	47
 Scopo della tesi	53
 PROTOCOLLO SPERIMENTALE	54
 <u>CAPITOLO 6: Materiali e metodi</u>	54
6.1 Materiali	54
6.2 Metodi	55
6.2.1 Modello di Retinopatia indotta da ossigeno	55
6.2.2 Somministrazione di analoghi della SRIF	56
6.2.3 Isolamento dell'RNA retinico e preparazione del cDNA	56
6.2.4 RT-PCR quantitativa	57
6.2.5 Misurazioni SRIF	58
6.2.6 Autoradiografia	59

6.2.7 <i>Western Blotting</i>	61
6.2.8 <i>Immunoistochimica</i>	62
6.2.9 <i>Analisi statistica</i>	63
 <u>CAPITOLO 7: Risultati</u>	65
7.1 <i>Effetti dell'ipossia sulla SRIF</i>	65
7.2 <i>Effetti dell'ipossia sulla capacità di binding di sst₂ e sull'espressione di sst_{2A}</i>	67
7.3 <i>Effetti dell'ipossia sulla localizzazione di sst_{2A}</i>	70
7.4 <i>Effetti dell'ipossia su STAT3</i>	73
 <u>CAPITOLO 8: Discussioni e conclusioni</u>	76
8.1 <i>Effeti dell'ipossia sulla SRIF</i>	76
8.2 <i>Effeti dell'ipossia sull'sst₂</i>	77
8.3 <i>Cambiamenti dinamici nella localizzazione di sst_{2A} dopo l'ipossia</i>	78
8.4 <i>STAT3 come effettore dell'attivazione di sst₂</i>	80
8.5 <i>Conclusioni</i>	82
 LETTERATURA CITATA	83

Riassunto

Le malattie oculari derivanti da angiogenesi sono fra le più comuni cause di cecità nel mondo occidentale e derivano da un profondo sbilanciamento fra i livelli di fattori pro-angiogenici e quelli di fattori anti-angiogenici. Gli attuali trattamenti come la fotocoagulazione laser e la somministrazione di inibitori del VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) non sono sufficientemente efficaci, per cui c'è attualmente un grosso interesse per lo sviluppo di nuovi e più efficaci agenti terapeutici in grado di trattare la neovascolarizzazione oculare. A questo riguardo, gli analoghi del peptide somatostatina-14 (SRIF) possono giocare un ruolo importante nell'inibizione della neovascolarizzazione nella retina. In un modello murino di retinopatia indotta da ossigeno (OIR), il nostro gruppo di ricerca ha recentemente dimostrato che la gravità delle risposte angiogeniche all'ipossia è correlata al livello di espressione del recettore della SRIF ss_2 a livello retinico. Infatti, la mancanza di ss_2 , come quella che si realizza nei topi ss_2 knock out (KO), è associata ad un più pesante effetto dell'ipossia sulla neovascolarizzazione della retina e sulla produzione di fattori pro-angiogenici, compresi il VEGF e i suoi recettori, mentre un cronico aumento di espressione di ss_2 (conseguente alla delezione genica di un altro recettore per la SRIF, ss_1 , come quella che si realizza nei topi ss_1 KO) riduce gli effetti dell'ipossia sulla produzione di fattori pro-angiogenici. Inoltre, il nostro gruppo ha anche osservato, utilizzando due analoghi della SRIF, l'octreotide (un agonista preferenziale per ss_2) e il D-Tyr⁸ cianammide (CYN; un antagonista specifico per ss_2), che ss_2 media gli effetti antiangiogenici della SRIF e che tali effetti coinvolgono una riduzione dei livelli di espressione del VEGF.

Benché sia quindi chiaro, sia dagli studi del nostro gruppo di ricerca, sia dagli altri studi sopra menzionati, che gli analoghi della SRIF in grado di attivare ss_2

alterino l'espressione del VEGF nel modello OIR, non si hanno informazioni certe sulla localizzazione ove l'interazione fra ss_2 e VEGF abbia luogo. La spiegazione più semplice per come la stimolazione di ss_2 possa legarsi ad una riduzione dei livelli di VEGF e della proliferazione dei vasi retinici è quella di assumere che ss_2 sia espresso dalle cellule endoteliali della retina e che l'interazione con il VEGF abbia luogo in queste cellule. D'altra parte, studi di localizzazione di ss_2 nella retina di topo non ne riportano l'espressione a livello dei capillari e lo stesso dicasi per le retine degli altri mammiferi, benché ci siano evidenze del fatto che ss_2 sia localizzato sui vasi retinici nella retina umana. D'altronde, studi su cellule endoteliali provenienti dalla vena umbilicale umana hanno mostrato che ss_2 viene espresso alle cellule endoteliali in proliferazione ma non da quelle quiescenti, suggerendo che l'espressione di questo recettore possa aumentare nei capillari retinici in condizioni ipossiche.

Nonostante le crescenti evidenze che gli agonisti di ss_2 possano esercitare una attività angiointibitoria nella retina, un'altra informazione carente è quella relativa alle possibili vie che legano l'attivazione di ss_2 all'inibizione della risposta angiogenica o alla modulazione dei livelli di VEGF. Come più sopra riportato, è stato recentemente osservato come STAT3 sia critico nell'induzione del VEGF, indicando un ruolo per questo fattore di trascrizione nella regolazione della risposta angiogenica all'insulto derivante dall'ipossia. Infatti, è stato dimostrato che nel modello OIR, sia i livelli proteici di STAT3 che della sua forma attiva fosforilata, pSTAT3, aumentano nella retina neovascolarizzata, con pSTAT3 preferenzialmente localizzato a livello dei vasi neoformati.

In questo lavoro di tesi, abbiamo valutato se la ridotta disponibilità di ossigeno possa influenzare i livelli e la localizzazione di ss_2 nella retina di topo e se questo effetto possa essere correlato con alterati livelli di espressione della SRIF. Inoltre, abbiamo valutato se l'ipossia influenzi l'espressione e l'attività di STAT3

e se gli effetti dell'ipossia su STAT3 siano influenzati dal trattamento con octreotide o CYN.

Abstract

Angiogenic eye disease is among the most common causes of blindness worldwide and results from a profound imbalance between pro- and anti-angiogenic factors. Current treatments such as laser photocoagulation and administration of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) inhibitors are insufficiently effective and there is now a great deal of interest to develop new and more efficacious therapeutic agents to treat ocular neovascularization. In this respect, analogues of the peptide somatostatin-14 (SRIF) may play a role in inhibiting angiogenesis in the retina. In a mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR), we have recently demonstrated that the severity of angiogenic responses to hypoxia is correlated to the expression level of sst_2 in the retina. In fact, the lack of sst_2 , as in sst_2 -knock out (KO) retinas, is associated with heavier effects of hypoxia on retinal neovascularization and proangiogenic factors, including VEGF and its receptors, whereas a chronic overexpression of sst_2 (consequent to the genetic deletion of sst_1 as in sst_1 -KO retinas) attenuates hypoxia effects on proangiogenic factors. In addition, we have observed, using the SRIF analogues octreotide (a sst_2 -preferring agonist) and D-Tyr⁸ cyanamid 154806 (CYN; a sst_2 -specific antagonist), that sst_2 mediates SRIF antiangiogenic effects and that this mechanism involves a down regulation of retinal levels of VEGF.

Although it is clear that SRIF analogues acting at sst_2 affect the expression of VEGF in the OIR model, information on the precise sites where this interaction may take place is surprisingly lacking. The most parsimonious way to explain the observed inhibitory effects of sst_2 agonists on VEGF expression and on the proliferation of retinal vessels would be to assume that sst_2 is expressed by retinal endothelial cells and that its interaction with VEGF takes place in these cells.

However, localization studies of the mouse retina did not report sst₂ expression at the level of retinal blood capillaries, nor has this expression been noted in any other mammalian retinas, although there is some evidence that sst₂ is localized to retinal vasculature in the human retina. On the other hand, studies in human umbilical vein endothelial cells have shown that sst₂ and sst₅ are expressed in proliferating but not quiescent endothelial cells, which suggests that these receptors may be upregulated in retinal capillaries in hypoxic conditions.

Despite the growing evidence that sst₂ agonists may exert angioinhibitory activity in the retina, the downstream effectors linking sst₂ activation to inhibition of angiogenic response or to modulation of VEGF expression are still unknown. Recent studies demonstrated that the Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT)3 is critical to induce VEGF expression, thus indicating a role of STAT3 in regulating angiogenic response to the hypoxic insult. Indeed, in a mouse model of OIR, STAT3 and pSTAT3 protein levels increase in the neovascular retina with pSTAT3 preferentially localized to newly formed retinal vessels.

In the present study, we determined whether low oxygen availability may affect levels and localization of sst₂ in the mouse retina and whether this effect may be related to altered levels of SRIF expression. In addition, we evaluated whether hypoxia affects expression and activity of STAT3 and whether the effects of hypoxia on STAT3 are influenced by treatment with the sst₂ agonist octreotide or the sst₂-selective antagonist CYN.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

La retina

1.1 Caratteristiche retiniche

L'occhio è l'organo di senso che ci permette di vedere e la sua struttura ricorda da vicino quella di una macchina fotografica. Quando fissiamo un oggetto, la luce che da esso proviene entra nei nostri occhi, attraversa una serie di lenti naturali, che sono in sequenza la cornea, l'umor acqueo, il cristallino ed il corpo vitreo, e va ad "impressionare" la retina. La retina eccitata dalla luce che la colpisce trasmette informazioni sotto forma di impulsi elettrici al cervello attraverso il nervo ottico. L'occhio ha una forma ovoidale ed è avvolto da tre tuniche fibrose che procedendo dall'esterno verso l'interno, sono: la sclera, la coroide, la retina. Si chiude sul davanti con una membrana trasparente, la cornea, che si incastra come un vetro d'orologio alla sclera. Nel suo interno sono contenuti due liquidi che, oltre a provvedere al nutrimento delle varie strutture, danno consistenza e volume al globo oculare. Il primo liquido che troviamo è l'umore acqueo e occupa lo spazio della camera anteriore cioè lo spazio compreso tra superficie posteriore della cornea e superficie anteriore del cristallino. Il secondo liquido, di consistenza gelatinosa, è l'umore vitreo e occupa la cavità vitrea, cioè lo spazio compreso tra la superficie posteriore del cristallino e la retina (Figura1).

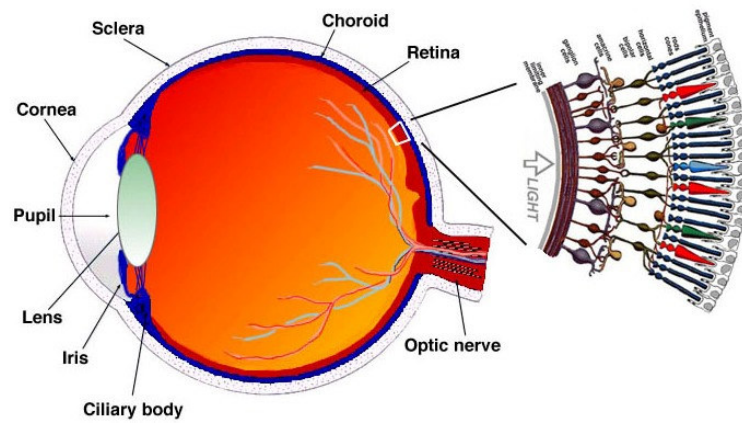


Figura 1. Sezione trasversale dell'occhio umano con uno schema della retina

La retina è la più interna delle tre tuniche che costituiscono la parete del bulbo oculare. Viene strutturalmente distinta in foglietto esterno, costituito dall'epitelio pigmentato retinico (RPE), e in foglietto interno, formato da cellule nervose (neuroretina) distinte in diverse categorie (Figura 2).

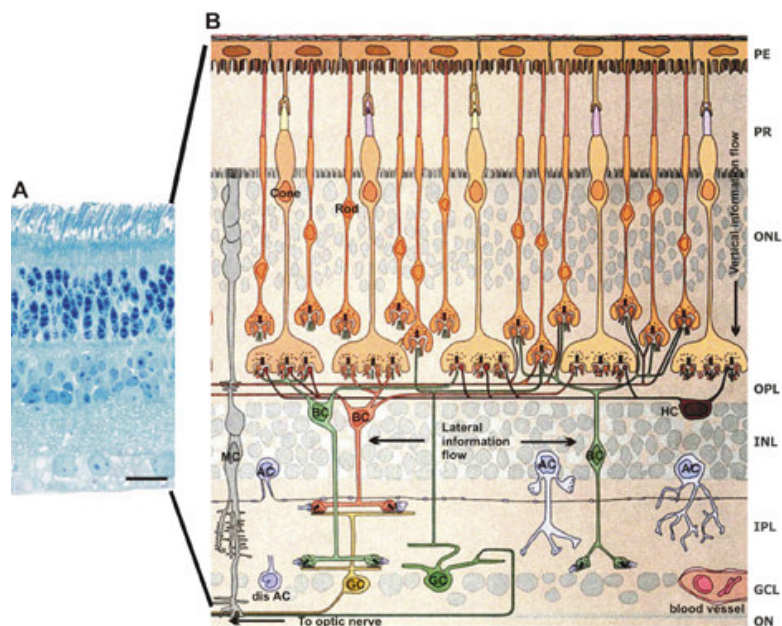


Figura 2. Assetto strutturale della retina. (A), Colorazione con blu di metilene della sezione semi-sottile di retina di cavia che mostra la disposizione strutturale dei neuroni e degli strati plessiformi. (B) Schema dei collegamenti della retina (Adattato da Rodieck 1998). PE: epitelio pigmentato; ONL (Outer Nucleare Layer): contiene corpi cellulari dei fotorecettori; OPL (Outer Plexiform Layer): contiene connessioni tra fotorecettori e cellule bipolari (BC) e orizzontali (HC); INL (Inner Nuclear Layer): contiene corpi cellulari di cellule orizzontali, bipolari e amacrine (AC); IPL (Inner Plexiform Layer): stazione per il passaggio di informazioni tra cellule bipolari e ganglionari (GC); GCL (Ganglion Cell Layer): contiene corpi cellulari di cellule ganglionari e amacrine.

Le cellule gliali e la macroglia costituiscono la prima categoria di cellule nervose. Sono cellule di supporto che regolano il metabolismo retinico e modulano la funzione dei neuroni e dei vasi (Abbott et al., 1992). Esistono due tipi principali di cellule di macroglia: le cellule di Müller e gli astrociti. Le prime attraversano lo spessore della retina dall'RPE fino alla membrana interna e sono i maggiori regolatori del metabolismo del glutammato, del bilancio ionico

extracellulare e della funzione neuronale. Gli astrociti, di contro, sono limitati allo strato di fibre nervose dove i loro processi ricoprono i vasi e le cellule ganglionari. Insieme, questi due tipi di cellule integrano le attività vascolari e neuronali nella retina. La seconda categoria di cellule nervose include i neuroni tra cui si distinguono fotorecettori, cellule bipolari, cellule amacrine, cellule orizzontali e cellule ganglionari. Questi neuroni mediano la fototrasduzione e modulano gli impulsi nervosi che vengono trasmessi al cervello dal nervo ottico. I fotorecettori si trovano più in profondità vicino all'RPE. L'unica eccezione è a livello della fovea in cui le cellule nervose sovrastanti sono spostate ai lati e i raggi luminosi raggiungono direttamente i fotorecettori. I neuroni sono, per definizione, le cellule che sottostanno alla visione per cui un danneggiamento della vista implica un disturbo della loro funzione. La microglia rappresenta la terza classe di cellule neuroretiniche. Sono cellule simili a macrofagi normalmente quiescenti ma estremamente sensibili a variazioni dell'omeostasi retinica a seguito delle quali si trasformano rapidamente in fagociti (Broderick et al. 2000). L'integrazione delle funzioni di queste classi cellulari è necessaria per una vista normale per cui la distruzione di ognuna di esse può comportare danni visivi. Sono considerate appartenenti alle cellule retiniche anche i periciti e le cellule endoteliali che circondano i vasi. Le tight junctions poste tra le cellule endoteliali costituiscono la barriera emato-retinica e proteggono la neuroretina dalle cellule infiammatorie e dai loro prodotti citotossici.

1.2 Apporto ematico retinico

La retina dei mammiferi riceve apporto ematico da due diverse fonti: l'arteria centrale retinica e i capillari della coroide. Questi ultimi garantiscono il maggior apporto di sangue (65-85%) necessario per fornire nutrienti allo strato più esterno

della retina, in particolare i fotorecettori. Il flusso restante (15-35%) arriva dall'arteria centrale attraverso il nervo ottico e irroro lo strato retinico più interno, fino allo strato ONL. L'arteria centrale si divide a sua volta in due rami principali dando origine poi alle arteriole retiniche (Hayreh, 1963). I vasi più grandi sono localizzati nella porzione centrale della retina vicino all'ILM; le loro pareti sono in relazione con le cellule gliali, in particolare con gli astrociti che ne garantiscono l'integrità (Rungger-Brandle et al., 1993; Zhang e Stone, 1997). Possono inoltre attraversare lo spessore retinico fino allo strato ONL (Wise et al., 1975). I vasi venosi sono distribuiti similmente agli arteriosi e lasciano l'occhio decorrendo parallelamente al nervo ottico.

Le arteriole originano un plesso capillare che si sviluppa su due livelli. Il primo è localizzato nello strato contenente fibre nervose e cellule ganglionari, l'altro, localizzato sopra a questo, si sviluppa attorno al disco ottico. L'estrema periferia retinica risulta invece avascolare. Una zona avascolare si realizza anche attorno ai vasi principali, probabilmente per gli alti livelli di ossigeno presenti (Henkind e De Oliveira, 1967). Gli strati retinici più esterni, inclusi i fotorecettori, sono avascolari e allo stesso modo della periferia retinica traggono i metaboliti necessari e l'ossigeno dalla coroide.

Le arterie retiniche differiscono dalle arterie di uguale diametro degli altri organi. Hanno infatti uno strato di cellule muscolari particolarmente sviluppato e mancano di una lamina elastica interna. Vicino al disco ottico i vasi sono costituiti da 5 a 7 strati di cellule muscolari, che si riducono a 2 o 3 nella zona equatoriale e 1 o 2 alla periferia. Le cellule muscolari sono orientate sia longitudinalmente che circolarmente e sono circondate dalla lamina basale (Hogan e Feeney, 1963). La parete capillare è composta da 3 diversi elementi: cellule endoteliali, periciti e lamina basale. Le cellule endoteliali sono tra loro

interconnesse tramite tight junctions e sono circondate anch'esse da lamina basale entro cui i periciti formano uno strato discontinuo.

1.3 Barriera emato-retinica

La presenza di una barriera emato-retinica (BRB) intatta è fondamentale per l'integrità strutturale e funzionale della retina. Allo stesso modo della barriera emato-encefalica, infatti, essa controlla il movimento di fluidi e molecole tra il letto vascolare oculare e i componenti retinici e protegge da macromolecole e agenti lesivi. La BRB possiede una componente interna (iBRB) e una esterna (oBRB). Nella iBRB l'elemento principale sembra essere costituito dalle cellule endoteliali dei capillari intraretinici e con esse le tight junctions che le uniscono (Shakib e Cunha-Vaz, 1966). Ad esse sono inoltre associati i processi di astrociti e cellule di Müller (Ashton, 1965; Reichenbach et al., 2007). L'ultima componente della iBRB è costituita dai periciti che contribuiscono al suo funzionamento. La oBRB è formata dall'RPE e dalle sue tight junctions, dalla coriocapillare e infine dalla membrana di Bruch (Cunha-Vaz). Quest'ultima costituisce lo strato interno della coroide e consta a sua volta di 5 strati: la membrana basale dell'RPE, la zona collagene interna, la banda centrale di fibre elastiche, la zona collagene esterna e la membrana basale della coriocapillare. La membrana di Bruch fornisce resistenza alla tensione e grazie alla presenza di proteoglicani costituisce una riserva di fattori di crescita.

1.4 Patologie retiniche derivanti da neovascolarizzazione

1.4.1 Retinopatia del prematuro (ROP)

La *Retinopatia del prematuro* (ROP), una malattia di neovascolarizzazione che interessa i neonati prematuri, è una delle cause più comuni di cecità infantile nel mondo. Recenti studi indicano che ogni anno negli Stati Uniti, il 68% dei circa 10.000 bambini nati con un peso alla nascita inferiore a 1250 g svilupperà ROP. Statisticamente il 36% di questi bambini sono a rischio di sviluppo di forme severe di ROP, una condizione che può portare a distacco della retina e cecità. L'incidenza della malattia è fortemente correlata con l'età gestazionale del bambino alla nascita. Più immaturo è il bambino, maggiore è la probabilità di sviluppare una forma severa di ROP (CRYO-ROP Cooperativa Group, 1988; Etrop cooperativa Group, 2003). La ROP è causata dalla perturbazione del processo di normale vascolarizzazione nello sviluppo della retina. La sua correlazione con l'età gestazionale deriva dal fatto che la retina è uno degli ultimi organi ad essere vascolarizzati nel feto umano. In neonati molto prematuri, la retina è quasi avascolare alla nascita. Il processo di sviluppo vascolare retinico normalmente si verifica in condizioni uterine ipossiche, ma in questi bambini deve avvenire in condizioni relativamente iperossiche extra-uterine. Questo porta all'arresto della crescita dei vasi sanguigni della retina, seguito dalla loro crescita non regolata nella cavità vitrea, con conseguenze potenzialmente catastrofiche. Nel feto umano, lo sviluppo dei vasi sanguigni della retina inizia nel corso del quarto mese di gestazione (Figura 3) (Foos and Kopelow, 1973; A.M. Roth, 1977). Pertanto, la retina dei bambini nati prematuramente presenta una vascolarizzazione incompleta, con una zona periferica avascolare, la cui

estensione è tanto maggiore quanto minore è l'età gestazionale. Nella ROP si possono distinguere due fasi. Nella prima fase la normale crescita vascolare della retina che si avrebbe nell'utero viene a cessare, e si verifica la perdita di alcuni dei vasi sviluppati. Con la crescita del bambino, la conseguente retina non vascularizzata diventa sempre più attiva metabolicamente e, di conseguenza, sempre più ipossica.

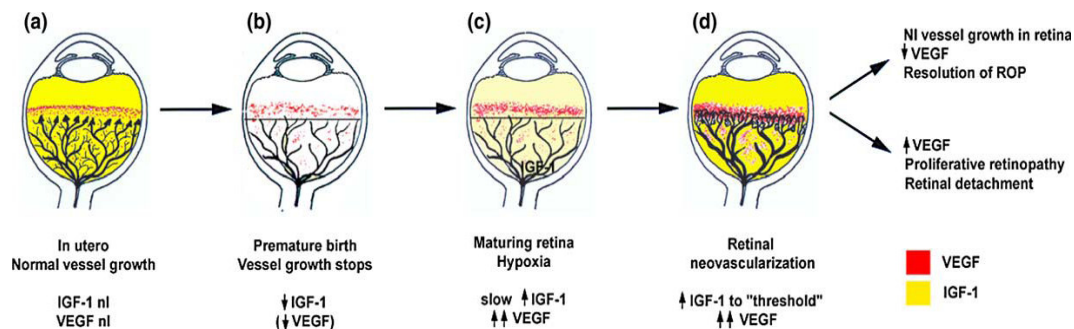


Figura 3. Meccanismi della retinopatia del prematuro (ROP)

La neovascolarizzazione retinica, la seconda fase di ROP, è indotta appunto dall'ipossia (I. Michaelson, 1948; N. Ashton et al. 1954), e si verifica a circa 34 settimane post-mestruali.

Per studiare la patologia a livello molecolare, è stato sviluppato un modello murino. Le retine di animali come topi e ratti, nati a termine, sono vascularizzate in modo incompleto alla nascita e assomigliano allo sviluppo vascolare retinico dei lattanti prematuri. L'esposizione di questi animali a iperossia causa vaso-obliterazione e la cessazione del normale sviluppo dei vasi sanguigni retinici, che simula la fase I della ROP (Ashton et al. 1954; N. Ashton, 1966; Smith et al. 1994; Penn, 1994; McLeod et al. 1996). Quando gli animali tornano in condizioni di normossia, le porzioni non perfuse della retina diventano

ipossiche, e questo a sua volta causa la neovascolarizzazione della retina, simile alla fase II della ROP e di altre retinopatie.

Come detto, ciò che spinge la fase di retinopatia proliferativa è l'ipossia. In questa fase un ruolo determinante viene svolto dal VEGF, una citochina ipossia-inducibile (Platee et al. 1992; Shweiki et al. 1992; Kim et al. 1993) ad azione mitogena nei confronti delle cellule dell'endotelio vascolare (Kim et al. 1993). Nella retina di topo, l'ipossia, stimola un aumento dell'espressione di VEGF prima dello sviluppo della neovascolarizzazione (Platee et al. 1992; Shweiki et al. 1992; Kim et al. 1993; Smith et al. 1994; Penn et al. 1994; Pierce et al. 1995; McLeod et al. 1996). Inoltre, l'inibizione del VEGF riduce la risposta neovascolare (Aiello et al. 1995; Robinson et al. 1996), con l'indicazione che il VEGF è un fattore critico nella neovascolarizzazione retinica. Questi risultati sono in accordo con quanto osservato clinicamente. Infatti, i livelli di VEGF sono elevati nel vitreo dei pazienti con neovascolarizzazione retinica (Aiello et al. 1994; Adamis et al. 1994).

La presenza di VEGF è comunque richiesta anche per la normale crescita dei vasi sanguigni. Pertanto, in modelli animali, la fase I della ROP è anch'essa dipendente da VEGF. Nel momento in cui si sviluppa la vascolarizzazione, vi è una maggiore richiesta di ossigeno, che crea ipossia localizzata. Indotto da un'ondata di ipossia fisiologica che precede la crescita dei vasi (Stone et al. 1995; Pierce 1997), il VEGF è espresso in risposta all'ipossia, e i vasi sanguigni crescono seguendo lo stimolo del VEGF. Nel momento in cui l'ipossia si riduce per l'apporto di ossigeno da parte dei nuovi vasi formati, l'espressione dell'mRNA del VEGF è soppressa. Il supplemento di ossigeno interferisce con il normale sviluppo della ROP nei modelli di topo e di ratto. L'iperossia utilizzata nei modelli animali causa la cessazione della normale crescita dei vasi attraverso la soppressione del VEGF, causando la perdita dell'ondata fisiologica di VEGF

precedente alla crescita vascolare. Inoltre, la vaso-obliterazione indotta da ipossia è causata da apoptosi di cellule endoteliali vascolari e la vaso-obliterazione può essere, almeno in parte, impedita con la somministrazione di VEGF esogeno (Alon et al. 1995). Ciò indica che il VEGF è necessario per il mantenimento del sistema vascolare retinico immaturo e spiega, almeno in parte, l'effetto dell'iperossia sul normale sviluppo dei vasi nei modelli di ROP.

Sebbene il VEGF e l'ossigeno svolgano un ruolo importante nello sviluppo dei vasi sanguigni della retina, è chiaro che anche altri mediatori sono coinvolti nella patogenesi della ROP.

La prematurità è il fattore più significativo di rischio per la ROP, il che suggerisce che i fattori relativi alla crescita e allo sviluppo sono fondamentali per il processo di malattia. Poiché l'ormone della crescita (GH) è ritenuto coinvolto nella produzione della retinopatia diabetica proliferativa (J.E. Poulsen, 1953; Wright et al. 1969; Sharp et al. 1987), il GH e il fattore di crescita insulino-simile I (IGF-I), che ha molti degli aspetti mitogenici del GH, sono stati considerati quali potenziali candidati in grado di stimolare la fase proliferativa della retinopatia. Questa è infatti notevolmente ridotta in topi transgenici che esprimono un recettore per l'antagonista del GH o in topi normali trattati con analoghi della somatostatina che diminuiscono il rilascio di GH. L'inibizione di GH nella neovascolarizzazione è mediata attraverso l'inibizione di IGF-I, poiché la somministrazione sistemica di IGF-I ristabilisce completamente la neovascolarizzazione. Durante l'inibizione di GH e IGF-I, la produzione del VEGF indotta da ipossia rimane invariata, indicando che IGF-I non agisce direttamente attraverso il VEGF in queste condizioni. Una prova diretta del ruolo di IGF-I nella fase proliferativa della ROP è stata ottenuta nel modello murino di ROP in cui, la somministrazione di un antagonista del recettore di IGF-I sopprime la neovascolarizzazione senza alterare l'incremento dei livelli di VEGF

dovuto all'ipossia (Smith et al. 1999). Questi risultati suggeriscono un ruolo permissivo di IGF-I nella neovascolarizzazione retinica (Smith et al. 1997).

IGF-I sembra quindi regolare almeno in parte la neovascolarizzazione retinica attraverso il controllo dell'attivazione da parte del VEGF di altri fattori, stabilendo una relazione gerarchica tra IGF-I e i recettori del VEGF. Questi studi stabiliscono un ruolo critico per IGF-I nell'angiogenesi nel modello murino di ROP. IGF-I agisce in modo permissivo per consentire la massima stimolazione di VEGF nella crescita di nuovi vasi. Bassi livelli di IGF-I inibiscono la crescita vasale, nonostante la presenza di VEGF. Ciò suggerisce che IGF-I fornisce una funzione permissiva e il VEGF da solo può non essere sufficiente per promuovere l'angiogenesi retinica. Pertanto, IGF-I è candidato ad essere uno dei fattori critici non regolati da ipossia per lo sviluppo di ROP (Lois E.H. Smith, 2004).

1.4.2 Retinopatia diabetica (DR)

La *retinopatia diabetica* è la complicanza più frequente del diabete e la principale causa di cecità nei paesi sviluppati in tutto il mondo. Circa il 75% di tutti i pazienti diabetici presentano segni clinici di retinopatia entro 15 anni dalla comparsa dei sintomi di diabete e in questo periodo oltre il 10% sviluppa una riduzione della vista (Klein et al., 1984; Klein e Klein, 1995; Sjolie et al. 1997). Negli Stati Uniti, la retinopatia diabetica rappresenta l'8% della cecità legale, rendendo il diabete la principale causa di cecità negli adulti in età lavorativa. La retinopatia diabetica ha una progressione clinica caratteristica del modello di retinopatia ischemica (Klein e Klein, 1997; Aiello et al., 1998; Frank, 2004). Le alterazioni iniziali si manifestano con segni biochimici di stress ossidativo e segni cellulari di infiammazioni subcliniche. I primi cambiamenti vascolari

includono l'adesione dei leucociti alle pareti dei vasi (leucostasi), l'aggregazione delle piastrine, l'alterazione del flusso ematico, la degenerazione dei periciti e l'ispessimento delle membrane basali. L'obliterazione dei capillari della retina può causare ipossia localizzata, determinando l'incremento della produzione tissutale di fattori angiogenici, tra cui VEGF. Il rilascio di VEGF e di altri fattori angiogenici, tra cui proteasi della matrice extracellulare, determina un'alterazione della BRB, portando ad un aumento della permeabilità vascolare. Paradossalmente, nonostante l'aumento della produzione di VEGF, un potente fattore di sopravvivenza per le cellule endoteliali, le cellule endoteliali microvascolari degenerano, portando alla chiusura dei capillari e alla formazione di capillari acellulari non perfusi.

Oltre a promuovere la proliferazione di cellule endoteliali, i fattori angiogenici possono anche causare un incremento di espressione di proteasi e integrine, entrambe importanti per la migrazione delle cellule. Dietro il fronte di avanzamento delle cellule endoteliali proliferanti vi è un'area dove le cellule endoteliali cessano di proliferare e si uniscono a formare un "lumen" che diventa un nuovo capillare. Infine, questi vasi si fondono e generano una rete che fa circolare sangue nella nuova regione vascolarizzata. Questa nuova rete vascolare in seguito matura e si rimodella per formare una rete vascolare stabile (Hanahan and Folkman 1996). Tuttavia, questi nuovi vasi sono fragili, con una BRB dalla funzionalità alterata e potenzialmente emorragici. Durante la progressione della malattia, le alterazioni vascolari, sono evidenti all'esame oftalmoscopico. La perdita vascolare aumenta, e sangue e fluidi si accumulano all'interno del tessuto retinico, formando depositi essudativi. Questa condizione è denominata *retinopatia diabetica non-proliferativa* (NPDR). Il gonfiore dei tessuti causato da accumulo di un eccesso di fluido interstiziale può alterare i processi metabolici dei neuroni retinici e delle cellule gliali. La condizione di edema maculare

diabetico è un po' più comune in pazienti con diabete di tipo 2 (7,5%) che in quelli con diabete di tipo 1 (5,9%) (Hirai et al., 2008).

In alcuni pazienti, la NPDR progredisce a retinopatia diabetica proliferativa (PDR). La PDR è caratterizzata da una crescita di nuovi vasi sanguigni sulla superficie della retina, analoghi a quelli che si formano durante la fine della ROP. I nuovi vasi sanguigni sono fragili e possono rompersi, facendo fuoriuscire sangue nella retina e nel vitreo neurale, occludendo così il vitreo e compromettendo la visione. Con l'avanzare della PDR, il tessuto fibrovascolare cicatriziale cresce dalla superficie della retina fino alla cavità del vitreo. Se non trattata, può causare il distacco della retina con conseguente cecità.

Mentre le modifiche microvascolari chiaramente svolgono un ruolo importante nella retinopatia diabetica, crescenti evidenze suggeriscono che anche i neuroni presentano notevoli alterazioni funzionali durante i primi mesi di corso del diabete (Antonetti et al., 2006). Gli studi clinici hanno dimostrato elettroretinogrammi alterati anche prima della diagnosi clinica della retinopatia diabetica (Ghirlanda et al., 1997; Han et al., 2004). Recenti studi hanno dimostrato difetti di campo nei pazienti con segni di retinopatia bassi o non presenti. Studi su modelli di diabete sperimentale condotti nel ratto hanno dimostrato che i neuroni della retina sono sottoposti ad apoptosi entro 1 mese dall'esordio del diabete (Barber et al., 1998). Il modello murino di diabete Ins2 Akita è stato trovato avere un aumento dei livelli di attività di un marker apoptotico, la caspasi 3, in una fase precoce del processo della malattia (Barber et al., 2005).

Studi clinici multicentrici hanno dimostrato che la terapia insulinica riduce i rischi di complicazioni diabetiche, compresa la retinopatia diabetica (DCCT, 1993; UKPDS, 1998). Le cause specifiche delle lesioni retiniche e la progressione della malattia in pazienti diabetici non sono ancora chiare. Tuttavia,

studi clinici e su modelli sperimentali sostengono fortemente il concetto che l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue e nei tessuti stimola la produzione di fattori angiogenici, fra i quali il VEGF è stato individuato come principale mediatore delle alterazioni vascolari nella retinopatia diabetica (Duh e Aiello, 1999; Miller et al., 1997; Frank, 2004). Alti livelli di glucosio, stress ossidativo, ipossia e reazioni infiammatorie, che concorrono tutti nel diabete, sono tutti in grado di stimolare l'espressione del VEGF. Inoltre, durante il decorso del diabete, si ha un incremento dell'espressione di VEGFR-2, il recettore che sembra principalmente coinvolto nella mediazione degli effetti del VEGF a livello delle cellule endoteliali (Gilbert et al., 1998; Hammes et al. 1998).

1.4.3 Degenerazione maculare senile (AMD)

La *degenerazione maculare senile* (AMD) è una delle principali cause di perdita della vista in tutto il mondo, e la principale causa di cecità negli individui con oltre 70 anni di età (Resnikoff et al., 2004).

La malattia colpisce milioni di persone ogni anno, soprattutto nei paesi dove l'aspettativa di vita è maggiore. La AMD è un processo di invecchiamento dell'occhio, durante il quale la zona centrale della retina, la macula, si altera sino a perdere la sua funzione. Con l'invecchiamento si manifestano progressive modificazioni in un insieme di strutture tra loro adiacenti situate al di sotto della retina maculare (RPE, membrana di Bruch, coriocalpillare). Al processo degenerativo maculare concorrono sclerosi dei vasi della coroide, accumulo di lipidi nella membrana di Bruch e alterazioni del metabolismo dell'RPE. In queste condizioni il fisiologico passaggio di ossigeno e nutrienti dalla coroide alla retina diventa difficoltoso. Contemporaneamente i detriti derivanti dai fotorecettori che normalmente vengono metabolizzati ed eliminati dall'RPE si accumulano a

formare depositi sotto l'epitelio pigmentato stesso chiamati drusen. La AMD si presenta clinicamente in due forme principali: l'atrofica o "secca" e l'essudativa o "umida". La prima è quella più frequente (90% dei casi), a decorso più lento, con progressiva alterazione della visione centrale; comprende lesioni centrali della macula causate da accumulo di drusen. La forma secca può, talvolta, trasformarsi in forma umida. La forma umida (proliferativa) è caratterizzata invece da un'evoluzione acuta e drammatica e risulta più invalidante della prima, con compromissione visiva grave e repentina. La degenerazione maculare essudativa è legata alla crescita al di sotto della retina maculare di una membrana vascolare che si origina dalla coroide che, provocando emorragie ed edema, danneggia improvvisamente e irreversibilmente la macula stessa.

Le forme proliferanti riguardano soltanto il 10% delle AMD ma costituiscono il 90% dei casi di cecità legale da degenerazione maculare. L'AMD riconosce come causa principale i fenomeni di senescenza che coinvolgono il complesso retina-coroide, anche se in realtà non si conoscono ancora perfettamente tutti i meccanismi che la determinano. Oltre all'età, alla patogenesi della lesione contribuiscono vari fattori di rischio quali il fumo, l'eccessiva esposizione alla luce o ai raggi UV, alcune carenze nutrizionali, l'ipertensione arteriosa sistemica e lo stress ossidativo. L'AMD si sviluppa in età senile con cause multifattoriali che includono mutazioni genetiche e fattori ambientali stressogeni che con tutta probabilità si accumulano durante la vita. Ciò sembra comune alle varie forme di AMD caratterizzate da neovascolarizzazione e l'espressione patologica di VEGF.

CAPITOLO 2

Neovascolarizzazione e angiogenesi

La vascolarizzazione è il processo di formazione di vasi sanguigni e può svilupparsi con due diverse modalità che differenziano la vasculogenesi dalla angiogenesi. La vasculogenesi è il processo di formazione de-novo di vasi a partire da cellule staminali, quali gli angioblasti, che si verifica nei primi stadi di embriogenesi (Risau et al., 1995; Patan, 2004), anche se i precursori delle cellule endoteliali si ritrovano anche nell'adulto all'interno del midollo osseo e sono reclutati dai tessuti in caso di trauma o ischemia (Zammaretti et al., 2005). Nel processo di angiogenesi (neovascolarizzazione), invece, i nuovi vasi si formano a partire da vasi preesistenti per sprouting delle cellule endoteliali. Nonostante il processo di angiogenesi sia alla base di numerose patologie (si pensi allo sviluppo dei tumori solidi) (Asahara et al., 1997; Djonov et al., 2000; Peichev et al., 2000; Djonov et al., 2003; Patan, 2004), esso ha comunque rilevanti funzioni fisiologiche come, ad esempio, nella rimarginazione delle ferite (Ruiter et al., 1993; Paavonen et al., 2000) e nella vascolarizzazione dell'endometrio (Ferrara et al., 1998).

Nell'adulto, in condizioni fisiologiche, il sistema vascolare è quiescente, eccezion fatta durante la cicatrizzazione, la crescita dei capelli ed il ciclo mestruale. Lo squilibrio nella domanda e offerta di ossigeno e sostanze nutritive, come avviene per esempio nella PDR, nella crescita del tumore, o nell'infarto del miocardio, si traduce in germinazione di nuovi capillari dai vasi pre-esistenti mediante angiogenesi. La locale crescita di vasi è indotta dal rilascio di fattori angiogenici solubili da parte dei tessuti coinvolti, che attivano le cellule endoteliali. Le interazioni dei fattori angiogenici con i loro recettori forniscono

segnali per la migrazione delle cellule, la proliferazione e la differenziazione per formare nuovi capillari.

Come già in precedenza accennato, l'angiogenesi è un processo complesso, caratterizzato da un cascata di eventi quali una vasodilatazione iniziale accompagnata da un aumento della permeabilità vascolare e dal degrado della matrice circostante, che consente alle cellule endoteliali attivate e proliferanti di migrare e formare nuovi vasi. I vasi derivati dallo sprouting di cellule endoteliali sono supportati da una rete di cellule peri-endoteliali differenziate e matrice. Successivamente, in una fase di maturazione e rimodellamento, questi nuovi vasi prendono posto a formare una rete vascolare. L'invasione delle cellule endoteliali e la migrazione richiedono la presenza di varie attività enzimatiche quali quella dell'attivatore del plasminogeno, della metalloproteasi della matrice e di varie cisteina-proteasi (Mignatti Rifkin, 1996). L'espressione dei geni delle proteasi è indotta da citochine e fattori angiogenici come il fattore di crescita basica dei fibroblasti (bFGF) e il VEGF, mentre la proteolisi è stimolata dall'attivazione di pro-proteasi da una parte, e da sotto regolazione dei livelli di inibitori endogeni di enzimi proteolitici. Le cellule endoteliali attivate esprimono integrine come $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$ che ne consentono la migrazione attraverso la matrice degradata, seguita da una loro proliferazione. Successivamente, le cellule endoteliali dei nuovi capillari formati sintetizzano una nuova membrana basale. Inoltre, la stabilizzazione dei nuovi capillari è accompagnata da assunzione di periciti e cellule muscolari lisce (Crocker et al., 1970). Questo processo è regolato dal fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF; Lindahl et al., 1997; Hellström et al., 2001a). Il processo di angiogenesi è strettamente controllato da un equilibrio dinamico tra fattori pro-angiogenici e fattori anti-angiogenici. In condizioni fisiologiche, in cui non avvengono processi di neovascolarizzazione, l'equilibrio fra fattori pro- e anti-angiogenici è spostato a favore di questi ultimi.

Fra i fattori anti-angiogenici sono stati identificati la trombospodina, l'angiostatina, l'endostatina, fattore derivante dall'epitelio pigmentato (PEDF), la somatostatina (colloqui e Harris, 2000; Carmeliet e Jain, 2000; Chader, 2001). I fattori pro-angiogenici includono il VEGF, l'FGF, il PDGF, l'angiopoietina, il transforming growth factor alfa e beta (TGF- α , TGF- β), il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) e l'interleuchina-8 (IL-8). Numerose sono le prove che sostengono che il principale fattore pro-angiogenico sia il VEGF (Ferrara, 1999). Il VEGF stimola le cellule endoteliali a degradare la loro membrana basale, a migrare e ad esprimere le integrine $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$. Inoltre, il VEGF è in grado di stimolare *in vitro* la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule endoteliali, nonché la formazione di tubi da parte delle cellule endoteliali stesse.

CAPITOLO 3

Il VEGF

Il VEGF, una glicoproteina dimerica di circa 40 kDa, è un potente mitogeno che stimola la proliferazione delle cellule endoteliali, la loro migrazione e la formazione da parte di esse di nuovi vasi durante il processo di angiogenesi. Il VEGF è essenziale durante lo sviluppo, la soppressione anche di un singolo allele nel topo arresta l'angiogenesi e provoca letalità embrionale (Ferrara et al., 1996). Nei mammiferi, la famiglia del VEGF si compone di sette membri: VEGF-A (in genere la forma a cui ci si riferisce quando si parla semplicemente di VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PlGF (fattore di crescita placentare). Lo splicing alternativo risulta in diverse varianti di VEGF. Negli esseri umani, queste includono i relativamente abbondanti VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ e VEGF₂₀₆, e diverse forme meno abbondanti. La solubilità di queste varianti (collettivamente denominate VEGF_{xxx}) dipende dall'affinità con cui legano l'eparina. Il VEGF₂₀₆ e il VEGF₁₈₉ sono le forme non solubili in quanto si legano saldamente all'eparina e, quindi, restano sequestrati nella matrice extracellulare. Il VEGF₁₆₅ lega l'eparina con minore affinità, ma può anche essere associato con la matrice, mentre il VEGF₁₂₁ manca della capacità di legare l'eparina ed è quindi la forma di VEGF più solubile.

Il VEGF-A è coinvolto nell'aumento della permeabilità vascolare e nell'angiogenesi. Il VEGF-B è attualmente studiato per il suo ruolo nella progressione tumorale non legata a processi di angiogenesi, mentre il VEGF-C e il VEGF-D sono ampiamente studiati per il loro ruolo nella angiogenesi e linfangiogenesi nel cancro. Il PlGF induce un aumento nella permeabilità vascolare, la proliferazione, chemiotassi e angiogenesi e può agire

sinergicamente con VEGF-A nell'angiogenesi patologica (Carmeliet et al. 2001). Il VEGF-E, di origine virale, è anch'esso un potente fattore angiogenico.

3.1 Regolazione dell'espressione del VEGF durante l'angiogenesi nella retina

Una delle cause principali dell'angiogenesi, come sopra riportato, è l'ipossia, la quale causa un incremento nell'espressione del VEGF attraverso l'attivazione del fattore di trascrizione HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor-1; Semenza, 2003). HIF è un fattore di trascrizione eterodimerico costituito da una subunità α regolata e da una subunità β espressa costitutivamente. In condizioni di normossia, HIF-1 α viene rapidamente ossidata da delle idrolisi, ubiquitinata ed avviata alla degradazione da parte del proteasoma; in condizioni di ipossia HIF-1 α sfugge a questa degradazione, inizia ad accumularsi nella cellula, dimerizza con HIF-1 β ed attiva la trascrizione di una serie di geni, fra cui quello del VEGF (Arjamaa and Nikinmaa, 2006). Recenti studi hanno comunque dimostrato che anche altri fattori di trascrizione, oltre a HIF-1, sono implicati nella regolazione della trascrizione del VEGF (Josko and Mazurek, 2004) e, fra questi, STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) è critico nell'indurre l'espressione del VEGF (Chen and Han, 2008). STAT3 è una proteina citoplasmatica che, a seguito dell'attivazione che si produce dopo fosforilazione della Tyr 705, forma un dimero e trasloca nel nucleo, ove attiva la trascrizione di una serie di geni bersaglio. Recenti studi hanno dimostrato che la massima induzione del VEGF dopo ipossia richiede il legame contemporaneo di STAT3 e HIF-1 al promotore del VEGF (Gray et al., 2005).

3.2 I recettori del VEGF

Sono stati individuati finora tre membri della famiglia dei recettori del VEGF (Figura 4).

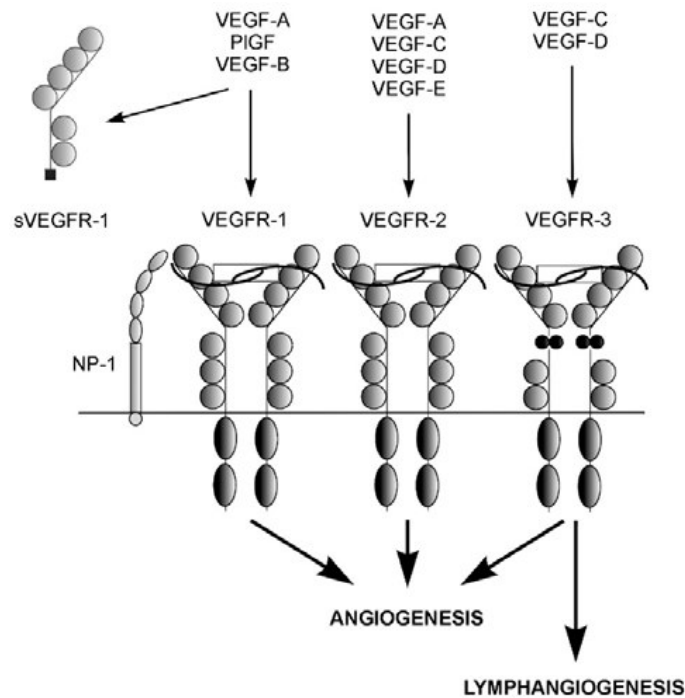


Figura 4. La famiglia del VEGF e i suoi recettori.

Due di essi, cioè VEGFR-1 (o Flt-1) e VEGFR-2 (o Flk-1 o KDR), sono recettori ad alta affinità per il VEGF-A. Il terzo recettore, VEGFR-3 (o Flt-4), è un recettore specifico per il VEGF-C e il VEGF-D (Joukov et al., 1996). VEGF-C e VEGF-D legano anche VEGFR-2, ma con una minore affinità rispetto a quella con cui si legano a VEGFR-3. VEGF-B e PlGF si legano con elevata affinità soltanto a VEGFR-1, mentre VEGF-E si lega in maniera specifica a VEGFR-2. I

tre recettori sono delle tirosina chinasi e sono strutturalmente legati alla famiglia dei recettori PDGF (classe III), contenente sette domini extracellulari Ig-like, un unico dominio idrofobico transmembrana e un dominio intracellulare conservato tirosin-chinasico interrotto da un dominio ad inserto chinasico. Il gene per il VEGFR-1 codifica per due polipeptidi: una proteina di membrana integrale e una proteina solubile che lega il VEGF (sVEGFR-1). Inoltre, la neuropilina-1 (NP-1) è stata recentemente identificata come co-recettore per VEGF migliorando il legame di VEGF-A a VEGFR-2 (Fuh et al., 1998). Un suo ruolo nello sviluppo vascolare è comprovato dal fatto che topi KO per NP-1 sono affetti da anomalie e ritardi nello sviluppo del sistema cardiovascolare (Witmer et al. 2003).

3.3 Trasduzione del segnale attraverso i VEGFRs

3.3.1 VEGFR-1

Restano controversi i concetti riguardo la funzione che il VEGFR-1 svolge nel signalling del VEGF nelle cellule endoteliali. Alcuni studi suggeriscono che nelle cellule endoteliali VEGFR-1 funzioni da regolatore negativo di VEGFR-2, disciplinando l'attività dei VEGF sull'endotelio vascolare, agendo da tampone nei confronti del ligando. VEGF-A mutanti che si legano selettivamente a VEGFR-2 sono in grado di indurre mitogenesi e chemiotassi nelle cellule endoteliali, la permeabilità vascolare e angiogenesi *in vivo*, mentre VEGF-A mutanti che si legano selettivamente al VEGFR-1 non hanno queste attività (Keyt et al., 1996; Gille et al., 2001;). Il VEGF-E, che si lega solo al VEGFR-2, esercita una potente attività angiogenica paragonabile a quella del VEGF-A, e ciò suggerisce che il VEGFR-2 possa mediare efficacemente l'angiogenesi senza

concomitante attivazione del VEGFR-1 (Meyer et al., 1999). Inoltre, topi che esprimono una forma di VEGFR-1 che manca del dominio tirosino- chinamico, ma è ancora in grado di legare il VEGF-A, sono vitali e non mostrano effetti negativi sullo sviluppo embrionale e sull'angiogenesi, mentre i topi VEGFR-2 KO sono soggetti a morte embrionale (Hiratsuka et al., 1998).

L'attivazione del VEGFR-1 sembra essere coinvolta nella migrazione dei monociti indotta da PlGF e VEGF-A (Clauss et al., 1996), e negli effetti pro-coagulanti esercitati dal VEGF-A (Clauss et al., 1996). Nell'insieme, è controverso se VEGFR-1 abbia un ruolo funzionale nella trasduzione del segnale in cellule endoteliali, considerando che nei periciti e nelle cellule muscolari lisce dei vasi VEGFR-1 può agire come un recettore funzionale, eventualmente coinvolto nei segnali di VEGF-A e PlGF in condizioni patologiche (Luttun et al. 2002). VEGFR-1 ha una forma solubile (sVEGFR-1) che è espressa in condizioni fisiologiche e inibisce *in vitro* la migrazione indotta da VEGF e la proliferazione delle cellule endoteliali microvascolari umane e delle cellule endoteliali umane della vena ombelicale (HUVECs; Zachary e Gliki, 2001). La forma sVEGFR-1 è altamente espressa nella placenta (Vuorela et al., 2000) dove la sua funzione fisiologica durante la gravidanza è quella di regolare i livelli di VEGF-A in modo negativo (Hornig et al., 2000; Regnault et al., 2002).

3.3.2 VEGFR-2

Il VEGFR-2 è considerato come il recettore che media il signalling del VEGF nelle cellule endoteliali. L'attività di tirosina chinasi del VEGFR-2 è maggior rispetto a quella del VEGFR-1 in condizioni sperimentali. Il VEGF-E ligando specifico per VEGFR-2, induce la migrazione e la germinazione di cellule

endoteliali *in vitro* e l'angiogenesi *in vivo* (Meyer et al., 1999). Inoltre, il VEGF-A induce l'espressione della ossido nitrico sintasi endoteliale (Shen et al., 1999), la produzione di NO (Kroll and Waltenberger, 1999), la riorganizzazione del citoscheletro, la proliferazione e la migrazione nelle cellule endoteliali aortiche suine (PAE) che esprimono il VEGFR-2, ma non in quelle che esprimono soltanto il VEGFR-1 (Waltenberger et al., 1994). Il VEGFR-2 è coinvolto anche nell'attivazione della via fosfatidilinositolo 3-chinasi (Pi3) / Akt, identificata come via di trasduzione del segnale nel processo che porta alla sopravvivenza delle cellule endoteliali indotta da VEGF-A (Gerber et al., 1998a; Thakker et al., 1999).

3.3.3 VEGFR-3

L'mRNA del VEGFR-3 si trova nell'endotelio venoso nelle prime fasi di sviluppo embrionale. In tessuti umani adulti, solo l'endotelio linfatico e di poche venule esprime l'mRNA del VEGFR-3 (Kaipainen et al., 1993, 1995; Kukk et al., 1996). Studi recenti hanno dimostrato che VEGFR-3 è espresso nell'endotelio dei vasi sanguigni quiescenti adiacenti all'epitelio in tutto il corpo umano (Partanen et al., 2000; Witmer et al., 2002b), suggerendo che VEGFR-3 e i suoi ligandi sono coinvolti in un rapporto paracrino tra cellule epiteliali ed endoteliali. Inoltre, il VEGFR-3 è coinvolto nell'angiogenesi in vari tumori (Valtola et al., 1999; Partanen et al., 1999; Saaristo et al., 2000; Witmer et al., 2001).

3.4 VEGF e recettori durante lo sviluppo

L'azione del VEGF-A è fondamentale sia durante lo sviluppo embrionale che durante la vita adulta. Nell'embrione l'espressione del VEGF-A si verifica dopo pochi giorni dalla sua formazione. Nei topi, negli stadi successivi, è espresso nel cuore, nel fegato, nel midollo spinale e nel cervello (Breier et al., 1992). Nel feto umano di 16-22 settimane il VEGF-A è espresso in tutti i tessuti ma soprattutto nel polmone, nel fegato e nella milza (Shifren et al., 1994). I topi alla nascita presentano un'intensa espressione del VEGF nello strato di fibre nervose e tale espressione tende ad aumentare fino al settimo giorno di vita. Successivamente, man mano che procede lo sviluppo vascolare, l'espressione del VEGF si riduce gradualmente (Penn et al., 2008). Tutti e 3 i recettori sono essenziali per il normale sviluppo della vascolatura embrionale ma con ruoli differenti. VEGFR-1 sembra infatti agire sui periciti mentre VEGFR-2 è fondamentale invece per la vasculogenesi embrionale tant'è che topi KO per l'uno o per l'altro recettore non sono vitali (Fong et al., 1995) a causa della distruzione dei precursori ematopoietici e del mancato sviluppo dei vasi (Shalaby et al., 1995). Nei topi KO per il recettore 3, la vasculogenesi si verifica lo stesso ma i vasi risultano organizzati in modo anomalo con lume difettoso e vi è, inoltre, un accumulo di liquido nella cavità pericardica accompagnato da problemi cardiaci. Tutto ciò conduce comunque alla morte embrionale al nono giorno di gestazione (Dumont et al., 1998). Durante lo sviluppo della retina l'espressione del VEGF si verifica inizialmente negli astrociti dello strato neuroblastico adiacente all'ILM vicino al disco ottico; da qui si sviluppa verso la periferia con una graduale down-regulation nella retina centrale. Con il progredire dello sviluppo l'espressione del VEGF scompare dallo strato superficiale e compare nelle cellule di Müller dell'INL in concomitanza con la formazione del plesso vascolare.

3.5 VEGF e recettori nell'adulto

Nell'uomo il VEGF-A è implicato nell'angiogenesi fisiologica. E' espresso inoltre in molti tessuti che non mostrano angiogenesi (Ferrara et al., 1992; Monacci et al., 1993; Ferrara, 1999), come l'epitelio dei glomeruli renali (Breier et al., 1992; Esser et al., 1998) e la mucosa gastrointestinale (Shifren et al., 1994; Terris et al., 1998). VEGF-A è in grado di mantenere la sopravvivenza e l'integrità delle cellule endoteliali mediante segnali anti-apoptotici (Gerber et al., 1998; Thakker et al., 1999). Il VEGF-A può inoltre indurre aumento della permeabilità vasale (Adamis et al., 1994; Aiello et al., 1994b; Qaum et al., 2001; Takeda et al., 2001). Nella retina il VEGF-A è secreto dall'RPE (Witmer et al., 2003) e tutti e 3 i recettori sono espressi sull'endotelio coriocalpillare (Blaauwgeers et al., 1999), per cui la distruzione dell'RPE causa atrofia della coriocalpillare (Korte et al., 1984). I periciti esprimono VEGFR-1 ma non VEGFR-2 mentre l'RPE esprime entrambi i recettori in seguito a stress ossidativo. Nel topo le cellule ganglionari esprimono entrambi i recettori. Ad oggi si sa che il VEGF-B è espresso soprattutto nel miocardio e nel tessuto muscolare scheletrico (Oloffson et al., 1996) sia dell'embrione che dell'adulto. Il VEGF-C è importante nello sviluppo del sistema linfatico durante l'embriogenesi e per il suo mantenimento nell'adulto (Kaipainen et al., 1995, Joukov et al., 1996; Kukk et al., 1996; Ymboussaki et al., 1998; Eriksson e Alitalo, 1999;). I ruoli fisiologici degli altri membri della famiglia del VEGF devono ancora essere chiariti.

3.6 Il VEGF e i suoi recettori nella retina in condizioni fisiologiche

Il processo di sviluppo del sistema vascolare della retina viene completato poco prima della nascita nell'uomo, e poche settimane dopo la nascita in diverse altre specie di mammiferi tra cui i roditori. Nello sviluppo del sistema vascolare della retina, è stato dimostrato il coinvolgimento di VEGF-A e suoi recettori VEGFR-1 e VEGFR-2 (Provis et al., 1997; Robinson et al., 2001). Il sistema vascolare coroidale si sviluppa in una fase precoce ed è preceduto da un picco di produzione del VEGF-A da parte dell'RPE, suggerendo che il VEGF-A è coinvolto nello sviluppo di questo sistema (Yi et al., 1998). Inoltre, VEGF-A e i suoi recettori sono coinvolti nel normale sviluppo neurale della retina nei topi, indipendentemente dallo sviluppo vascolare, perché VEGFR-1 e VEGFR-2 sono espressi al di fuori del sistema vascolare retinico nello sviluppo della retina, e la somministrazione di un antagonista del VEGFR prima dell'inizio dello sviluppo vascolare causa una diminuzione significativa dello spessore della retina (Robinson et al., 2001).

Nell'uomo adulto, le cellule endoteliali dei microvasi retinici sono coperte da periciti. Le cellule endoteliali e i periciti hanno la capacità di autoregolare la permeabilità e la perfusione dei vasi e sintonizzare l'omeostasi a livello microvascolare (Hirschi and D'Amore, 1996). La contrazione dei periciti causa alterazioni morfologiche del lume capillare (Chakravarthy and Gardiner, 1999). Questa autoregolazione sembra essere guidata da secrezione di citochine e mediatori che incidono su tali cellule in modo autocrino o paracrino, o da mediatori derivati da cellule del sangue.

Come in altri organi, il ruolo esatto del VEGF nella retina in condizioni fisiologiche non è chiaro. Diversi studi hanno dimostrato la presenza dell'mRNA

del VEGF-A e la sua espressione proteica nella retina (Gilbert et al., 1998; Stitt et al., 1998; Kim et al., 1999; Smith et al., 1999). E' stato inoltre osservato che tutti e tre i VEGFRs sono presenti in elementi neurali della retina interna (Witmer et al., 2002a). L'espressione dei recettori per il VEGF in questi elementi indica funzioni del VEGF in cellule non-vascolari della retina. Queste funzioni possono essere correlate alla sopravvivenza neuronale, come è stato dimostrato in precedenza dal fatto che il VEGF-A ha un effetto diretto neuroprotettivo sui neuroni *in vitro* dopo lesioni ischemiche, possibilmente attraverso il VEGFR-2 (Jin et al., 2000). L'espressione retinica di VEGFR-3 al di fuori del sistema vascolare suggerisce il coinvolgimento dei suoi ligandi VEGF-C e / o VEGF-D nella fisiologia retinica e indica che il sistema di segnalazione VEGF-C/VEGFR-3 non è esclusivamente limitato al sistema linfatico e vascolare.

3.7 Il VEGF e i suoi recettori nella retina in condizioni patologiche

3.7.1 Il VEGF nella ROP

Al contrario dell'ipossia, che svolge un ruolo importante nello sviluppo della retinopatia diabetica e nell'AMD, l'iperossia svolge un ruolo importante nella ROP. La ROP è un effetto collaterale dell'elevato utilizzo dell'iperossia per migliorare la sopravvivenza di neonati prematuri in sofferenza respiratoria. L'iperossia causa lo sviluppo di vasi retinici, presumibilmente perché lo stimolo per il normale sviluppo e/o la sopravvivenza è scomparso. Questo stimolo può essere l'espressione di VEGF-A, che viene soppresso dall'iperossia (Stone et al., 1996). Una volta che l'iperossia è terminata, è indotta la proliferazione vascolare

guidata dall'ipossia (Ashton, 1957; Ashton, 1966). Allo stesso tempo, l'espressione di VEGF-A è fortemente sovraregolata, raggiungendo livelli ancora più alti rispetto a quelli dello sviluppo di una retina normale. I meccanismi di questa proliferazione sarebbero, in maniera esasperata, gli stessi della normale crescita vascolare (Michaelson, 1948; Ashton, 1966).

Come già detto, è stato suggerito che l'IGF-1 svolga un ruolo cruciale nel normale sviluppo della retina e, probabilmente, nella patogenesi della ROP. La mancanza di IGF-1 nel primo periodo neonatale è associata con la mancanza di crescita vascolare normale e con il successivo sviluppo di una ROP (Hellström et al., 2001b). Questo fenomeno è stato studiato nei topi IGF-1 KO e in campioni di sangue raccolti da bambini con età gestazionale inferiore a 32 settimane. Il VEGF-A è normalmente espresso nei topi IGF-1 KO sebbene la crescita vascolare retinica sia significativamente ritardata. Ciò suggerisce che il VEGF-A potrebbe non essere in grado di stimolare la normale crescita vascolare in assenza di IGF-1. Inoltre, i bambini prematuri possono avere un normale sviluppo vascolare e non sviluppare ROP quando IGF-1, i cui livelli sono bassi alla nascita, aumenta rapidamente. E' stato ipotizzato che quando i livelli di IGF-1 rimangono bassi per un periodo di tempo prolungato, i vasi cessano di crescere, la retina diventa ipossica, e VEGFA si accumula nel vitreo. Nel momento in cui i livelli di IGF-1 aumentano al di sopra di ul livello di soglia, con alti livelli di VEGF-A presenti, viene rapidamente attivata la neovascolarizzazione (Hellström et al., 2001b).

3.7.2 Il VEGF nella PDR

Il VEGF-A può agire sinergicamente con altri fattori di crescita, come il PDGF, l'IGF-1 (Smith et al., 1997), il PlGF (Khaliq et al., 1998), e l'HGF (Paques et al., 1997; Grierson et al., 2000), nello sviluppo della PDR. La neovascolarizzazione nella PDR è probabilmente causata da alti livelli di VEGF-A nel vitreo, derivati dalla diffusa produzione di questo fattore nella retina ischemica. Infatti livelli elevati di VEGF-A sono stati trovati nell'umor acqueo e vitreo in pazienti con PDR (Adamis et al., 1994; Aiello et al., 1994a; Wells et al., 1996a; Shinoda et al., 1999). Nei modelli di retinopatia indotta da ossigeno nei neonati di topi e ratti, l'espressione del VEGF-A è correlata con l'angiogenesi e con l'aumento della comparsa dei sintomi di neovascolarizzazione, mentre ne viene evidenziato il suo declino nel momento in cui la neovascolarizzazione regredisce (Pierce et al., 1995; Miller et al., 1997). La proliferazione delle cellule endoteliali microvascolari retiniche *in vitro* è promossa da livelli di VEGF-A inferiori rispetto a quelli che *in vivo* determinano l'insorgenza di PDR (Thieme et al., 1995). Al momento, la fotocoagulazione laser (PRP) è il principale trattamento per la PDR. Tuttavia, i meccanismi alla base degli effetti benefici della PRP sono poco chiari. I livelli di VEGF-A nell'umor vitreo (Aiello et al., 1994a) e acqueo (Shinoda et al., 2000) sono diminuiti dopo PRP in pazienti con PDR, suggerendo che la ridotta espressione di questo regolatore positivo di angiogenesi è responsabile di un effetto benefico del trattamento. Ciò può verificarsi a causa della distruzione di cellule responsabili della produzione e del rilascio di stimoli angiogenici (D'Amore, 1994), ma è più probabile che ciò derivi dalla diminuzione del consumo di ossigeno della retina esterna a causa della perdita di fotorecettori (Lahdenranta et al., 2001). In alternativa, l'efficacia della terapia laser può essere dovuta ad un aumento dell'espressione di regolatori negativi di

angiogenesi. Infatti, è stata trovata un'associazione tra il rilascio di angiostatina, che normalmente non è presente negli occhi, e la riduzione della produzione di VEGF-A in pazienti con occhi trattati con PRP, anche se il rilascio di angiostatina non è sufficiente di per sé a neutralizzare l'attività pro-angiogenica (Spranger et al., 2000).

Un secondo potente inibitore endogeno dell'angiogenesi è il PEDF, che è un fattore neurotrofico della retina (Aymerich et al., 2001) ed è ritenuto essenziale per il mantenimento dell'omeostasi retinica (Stellmach et al., 2001; Chader, 2001; Ogata et al., 2001a). E' stato osservato che, in pazienti affetti da PDR, nelle aree di neovascolarizzazione non trattate, i livelli di PEDF sono diminuiti rispetto ai soggetti di controllo, mentre i livelli di VEGF-A sono aumentati (Spranger et al., 2001). In modo simile all'angiostatina, i livelli di PEDF nell'umor vitreo aumentano dopo PRP, anche se raggiungono valori che sono ancora al di sotto dei livelli trovati in persone non diabetiche (Spranger et al., 2001). Inoltre dopo PRP si ha un incremento della produzione di PEDF da parte dell'RPE (Ogata et al., 2001b). Questi risultati implicano che il PEDF svolge un ruolo importante nel proteggere la retina dall'angiogenesi patologica. Inoltre, nell'uomo, in condizioni di ipossia è stato trovato uno squilibrio tra l'espressione del VEGF-A e PEDF (Gao et al., 2001, 2002), che sostiene l'ipotesi che la neovascolarizzazione patologica si verifica a causa di un alterato equilibrio tra fattori pro- e anti-angiogenici. La produzione di PEDF è regolata dall'ipossia che risulta essere anche lo stimolo principale per il VEGF-A (Dawson et al., 1999).

3.7.3 Il VEGF nell'AMD

La neovascolarizzazione coroidale (CNV) è una delle principali cause di perdita visiva nell'AMD. Vasi di nuova costituzione, provenienti da vasi coroidali,

diffondono attraverso la membrana di Bruch nello spazio subretinico dell'RPE e/o all'interno dello spazio subretinico. L'ipossia, un elemento importante nella neovascolarizzazione della retina, può svolgere un ruolo anche nello sviluppo della CNV. Recenti prove suggeriscono un ruolo centrale di VEGF-A nello sviluppo della CNV. VEGF-A è presente nei fibroblasti e nell'RPE in membrane coroidali neovascolari escisse chirurgicamente (Kvanta et al., 1996; Lopez et al., 1996). L'espressione di VEGF-A è anche aumentata in cellule dell'RPE in pazienti con AMD (Kliffen et al., 1997), e in modelli sperimentali animali (Schwesinger et al., 2001). Sono stati trovati livelli di VEGF-A vitreali significativamente più elevati nei pazienti con AMD e CNV rispetto ai soggetti di controllo (Wells et al., 1996b). *In vitro*, è stato osservato che cellule dell'RPE secernono VEGF-A prevalentemente dal lato basolaterale, attraverso i capillari corioidei e, questa secrezione, aumenta significativamente durante ipossia (Blaauwgeers et al., 1999). *In vivo*, i recettori per il VEGF sono localizzati sul lato dell'endotelio coriocabillare rivolti verso le cellule dell'RPE, suggerendo un rapporto paracrino tra le cellule dell'RPE e i coriocabillari che si realizzerebbe nella regolazione dell'integrità dei coriocabillari e nel mantenimento del fenotipo permeabile e fenestrato del loro endotelio (Esser et al., 1998). E' stato ipotizzato che nell'invecchiamento, ma in particolare nell'AMD, questa relazione paracrina possa essere disturbata da un ispessimento della membrana di Bruch, che è meno permeabile ai composti idrosolubili come VEGFs, causando l'accumulo di lipidi (Holz et al., 1994). Il VEGF-A, quindi, potrebbe non essere in grado di raggiungere i coriocabillari e di mantenerne la funzionalità.

Di conseguenza, si avrebbe ipossia all'esterno della retina, con accumulo di VEGF-A dal lato dell'RPE della membrana di Bruch (Blaauwgeers et al. 1999; Spilisbury et al., 2000;). Questa ipotesi viene avvalorata dal fatto che l'induzione sperimentale dell'espressione del VEGF è sufficiente ad indurre la CNV

(D'Amore, 1994; Spilsbury et al., 2000;). Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono un ruolo importante per il VEGF-A nella patogenesi della CNV e nell'AMD.

CAPITOLO 4

Terapie anti-angiogeniche

La maggior parte delle nuove terapie per inibire l'angiogenesi retinica sono basate sul blocco di alcuni passaggi nelle varie fasi della cascata angiogenica. A tal proposito sono state messe in atto diverse tecniche che prevedono sia un approccio di tipo fisico che di tipo farmacologico impiegate nel trattamento delle varie forme di retinopatia (Wegewitz et al. 2005).

4.1 Terapie fisiche

4.1.1 Termoterapia laser con ablazione transpupillare dei vasi (TTT)

Questa tecnica è stata principalmente utilizzata per il trattamento della neovascolarizzazione coroidea nell'AMD (Liggett et al., 2006) e per l'ablazione dei vasi nella ROP (Capone et al., 1993). La TTT utilizza l'azione di raggi infrarossi in modo tale da elevare la temperatura nella parte posteriore dell'occhio inducendo così la chiusura dei vasi neoformati e risparmiando la retina sovrastante. Poiché tale trattamento dipende dalla pigmentazione oculare che può essere variabile, sfortunatamente alcuni pazienti possono subire delle scottature. I trattamenti laser, seppure consentano di arrestare o per lo meno di rallentare l'evoluzione di molte forme di degenerazione maculare essudativa, solo in pochissimi casi riescono a dare un miglioramento funzionale. Talora questi trattamenti hanno grosse limitazioni, come in presenza di grossi ematomi retinici che impediscono l'impatto con la luce laser e possono presentare

complicanze quali fenomeni emorragici e rotture iatrogene dell'epitelio pigmentato.

4.1.2 Fotocoagulazione laser

Ad oggi il solo trattamento approvato per la PDR è la fotocoagulazione laser. L'obiettivo primario di questa è quello di prevenire la progressione della neovascolarizzazione mediante l'uso di un raggio laser ad elevata temperatura che colpisce i vasi neoformati provocandone l'ablazione. Ciononostante in alcuni casi la fotocoagulazione non è sufficiente ad arrestare la patologia e talvolta si possono verificare distruzioni di alcune parti della retina che comportano perdita della visione crepuscolare. Può inoltre essere dolorosa e causare infiammazione, inducendo la ricrescita di nuovi vasi.

4.1.3 Terapia fotodinamica con verteporfina (PDT)

A differenza delle precedenti tecniche, questa utilizza luce a bassa temperatura la quale attiva la verteporfina somministrata per via endovenosa (Bressler, 2001), che si concentra all'interno dei vasi della membrana neovascolare sottoretinica. L'esposizione ad un raggio laser non termico (con lunghezza d'onda di 689 nm) determina l'attivazione della verteporfina che provoca la formazione di un trombo all'interno dei vasi patologici obliterandoli, senza danneggiare la retina sovrastante (Schmidt-Erfurth, 2000). Purtroppo la chiusura dei neovasi dopo un singolo trattamento è spesso solo temporanea per cui sono necessari più trattamenti in tempi successivi. L'effetto di questo trattamento è stato dimostrato soprattutto nei pazienti con AMD e in tali pazienti risulta il trattamento fino ad oggi maggiormente utilizzato. Gli effetti negativi di questo trattamento

riguardano l'interessamento anche dei vasi normali la cui chiusura può portare al rilascio di fattori proangiogenici in risposta all'insufficiente apporto di ossigeno.

4.1.4 Vitrectomia

Questo trattamento è utilizzato in stadi tardivi quando la patologia assume la massima gravità. Viene utilizzato soprattutto negli stadi più avanzati della ROP, ma anche nella PDR e nell'AMD. Con questo intervento, il vitreo viene sostituito con soluzione salina e viene rimosso il tessuto cicatriziale e l'eventuale emorragia. Si tratta di un intervento molto delicato che può comportare gravi rischi quale il distacco retinico. Deve quindi essere eseguito da chirurghi specializzati con vasta esperienza in merito e viene utilizzato come trattamento estremo.

4.2 Terapie farmacologiche

Nonostante sia limitato l'uso di terapie farmacologiche approvate dall'FDA, l'esigenza di poter utilizzare terapie efficaci, alternativa a quelle fisiche, ha spinto fortemente la ricerca nel campo delle terapie farmacologiche contro le retinopatie proliferative. Uno dei primi problemi da affrontare nell'approntamento di terapie di questo tipo è la scelta della via di somministrazione. In generale, possiamo dire che la somministrazione sistemica è generalmente ben accettata dai pazienti, ma ha l'inconveniente che, a causa della barriera emato-retinica, sono richieste dosi di farmaco ad alte concentrazioni per ottenere effetti efficaci sugli organi bersaglio. Inoltre, l'inibizione sistemica dell'angiogenesi potrebbe compromettere la risposta vascolare agli eventi ischemici nei pazienti con malattie cardiovascolari,

cerebrovascolari o vascolari periferiche. Al contrario, la somministrazione locale di agenti antiangiogenici nell'occhio, consentirebbe di evitare effetti collaterali sistemici, ma si tratta di una tecnica invasiva che richiede uno specialista qualificato. Per evitare questi problemi, in questi ultimi anni, stanno progredendo importanti ricerche nel campo dei sistemi di somministrazione intravitreali a lento rilascio. La terapia genica è un altro modo alternativo per risolvere il problema delle ripetute iniezioni intraoculari (Bainbridge et al. 2003; Borras T. 2003; Reich and Bennett 2003).

Una delle terapie farmacologiche messe a punto negli ultimi anni, attualmente approvata dall'FDA per l'utilizzo nelle forme più gravi di AMD essudativa e in fase di studio anche per l'applicazione al trattamento della PDR, riguarda l'inibizione del VEGF o dei suoi recettori. Visto l'effetto del VEGF sulle cellule endoteliali microvascolari, la sua inibizione presenta una azione benefica, bloccando la proliferazione vascolare e riducendo la permeabilità vasale (Bradley et al., 2007). D'altra parte, è stato osservato che l'inibizione del VEGF nella retina dovrebbe essere perseguita con cautela a causa della funzione neuroprotettiva di VEGF (Kilic et al., 2006; Nishijima et al., 2007). Inoltre, la terapia anti VEGF stabilizza la malattia piuttosto che aumentare l'acuità visiva e la regressione della neovascolarizzazione è raramente permanente. (Bradley et al., 2007). Inoltre, è stato osservato che nei topi, anche la sola mancanza di un allele per il VEGF porta a morte durante la fase di sviluppo embrionale dell'animale (Ferrara et al., 1996). Per tutta questa serie di motivi, dunque, la ricerca di nuove terapie che normalizzino il VEGF e la funzionalità dei vasi retinici è un campo ancora aperto.

Un'importante area di ricerca sta ponendo l'attenzione sull'azione degli analoghi della somatostatina (SRIF). La SRIF ha potenti effetti inibitori sulla secrezione

dell'ormone del GH (Hyer, 1987) ed è in grado di bloccare gli effetti locali dell'IGF-1, del VEGF e di altri fattori di crescita.

CAPITOLO 5

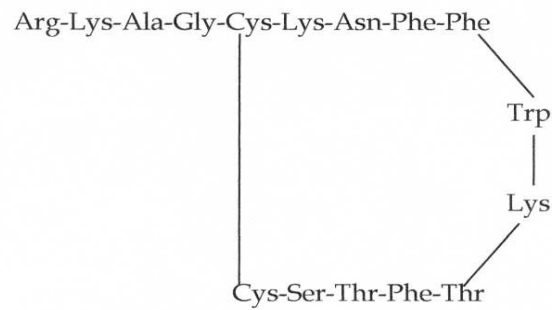
La somatostatina

5.1 La somatostatina e le sue funzioni

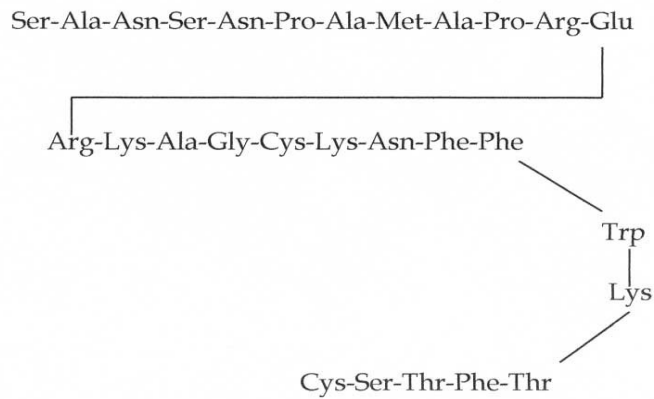
La storia della somatostatina ha inizio nel 1968 quando Krulich e Coli., nel tentativo di isolare il fattore ipotalamico capace di stimolare la secrezione della somatotropina o GH isolarono, invece, un peptide a basso peso molecolare con attività inibitoria. Un anno dopo, Hellman e Lernmark trovarono la medesima sostanza a livello delle isole pancreatiche di piccione. Solo nel 1973 il premio Nobel Roger Guillemin e i suoi collaboratori isolarono e sequenziarono un tetradecapeptide capace di inibire la secrezione della somatotropina e per questo lo chiamarono somatostatina (SRIF, somatotropin-release inhibiting factor). Studi successivi hanno dimostrato che la somatostatina viene prodotta, oltre che a livello ipotalamico, anche a livello del sistema nervoso centrale e periferico (Brazeau et al. 1973; Schulz et al. 2000; Tannenbaum and Epelbaum 2000) a livello pancreatico e nel tratto gastrointestinale.

Nei mammiferi la somatostatina è codificata da un unico gene (Krantic et al. 2004) e sintetizzata come parte di un precursore più grande, la pre-pro-somatostatina, lungo 116 amminoacidi e caratterizzato all'estremità N-terminale da un peptide segnale di 24 residui (Reichlin, 1983; Weckbecker et al., 1993; Barnett, 2003). Il precursore viene, però, rapidamente trasformato in un peptide lungo 92 amminoacidi, la pro-somatostatina. Nei mammiferi il proormone viene processato ad entrambe le estremità, N-terminale e C-terminale, dando come risultato due prodotti biologicamente attivi, la SRIF-14 e la SRIF-28 (Weckbecker et al. 1993) (Figura 5). Lungo la sequenza amminoacidica della pre-

pro-somatostatina sono presenti tre siti a livello dei quali il precursore viene tagliato grazie ad alcuni enzimi proteolitici per dare le differenti forme di SRIF: un sito dibasico (Arg-Lys) e un sito monobasico (Arg) all'estremità C-terminale che genera la SRIF-14 e -28, rispettivamente, e un sito monobasico (Lys) all'estremità N-terminale che dà origine alla pro-somatostatina.



Somatostatina-14



Somatostatina-28

Figura 5. Sequenza amminoacidica della SST-14 e della SST-28

La somatostatina-28 è costituita da 28 amminoacidi e contiene interamente, all'estremità C-terminale, la struttura della somatostatina-14, la quale risulta costituita da 14 amminoacidi tra i quali è presente un ponte disolfuro che lega il terzo e il quattordicesimo residuo. In realtà il nucleo attivo, responsabile dell'attività biologica della proteina, è ristretto ai residui 7, 8, 9, 10 (Phe- Trp- Lys-Thr). Le differenti forme molecolari di somatostatina non sono distribuite, nei diversi tessuti, in modo uniforme: la SRIF-14 predomina nel tessuto nervoso ed è virtualmente l'unica forma presente nella retina, nel sistema nervoso periferico, nel pancreas e nei neuroni presenti a livello dello stomaco; la SRIF-28 si trova, invece, ad elevate concentrazioni nel cervello, nell'intestino, nel pancreas e nello stomaco.

La SRIF influenza principalmente quattro processi: la neurotrasmissione, la secrezione ghiandolare, la contrazione della muscolatura liscia e la proliferazione cellulare (Lewin, 1992). La regolazione di questi processi è dovuta alla capacità della SRIF di agire come neurotrasmettitore, neuroormone o come mediatore ad azione paracrina o autocrina (Epelbaum, 1994). Nonostante la rapidità con la quale viene degradata, in alcune situazioni la concentrazione della SRIF è tale da poter influire sulla secrezione di ormoni sia ipofisari che pancreatici e da poter modificare alcune funzioni gastrointestinali.

La molteplicità e l'importanza delle azioni farmacologiche svolte dalla SRIF la rendono un importante agente terapeutico. Nel plasma la vita media della SRIF - 14 è al massimo di 2-3 minuti, mentre la SRIF -28 è un po' più resistente alla inattivazione da parte di peptidasi plasmatiche. La sua breve emivita plasmatica, unita alla scarsa selettività, dovuta alla molteplicità di organi bersaglio e di azioni fisiologiche svolte, ha portato alla ricerca di analoghi dotati di maggior selettività e di caratteristiche farmacocinetiche superiori alla SRIF endogena (Weckbecker et al. 1993; Hannon et al.2002).

Per ottenere, inoltre, un effetto duraturo la SRIF deve essere necessariamente somministrata per via endovenosa mentre gli analoghi possono essere somministrati anche per via sottocutanea ed ora, sperimentalmente, anche per via intranasale. Sono numerosi gli analoghi sintetizzati in questi anni; sicuramente il più conosciuto e utilizzato è l'*octreotide* (Figura 6).

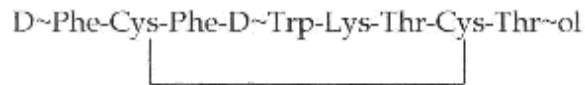


Figura 6. Sequenza amminoacidica dell'*octreotide*.

L'*octreotide*, costituito da 8 amminoacidi, contiene una porzione identica alla SRIF-14 compresa tra il settimo e il decimo residuo ed è stabilizzato da un ponte disolfuro che lega la Cys-3 con la Cys- 7; troviamo all'interno del peptide due residui non presenti in natura, la D-Phe e il D-Trp ed una Treonina contenente un gruppo alcolico. Grazie a queste modificazioni strutturali l'*octreotide* acetato ha un'emivita in circolo di 90 minuti. L'FDA ha approvato l'uso di preparazioni iniettabili di *octreotide* acetato per il trattamento dell'acromegalia e per il trattamento di alcune forme diarroiche legate a particolari forme di tumori intestinali (Hofland et al. 1999; Melmed et al.2002).

5.2 Famiglia dei recettori della Somatostatina (SST)

La caratterizzazione molecolare dei recettori della SRIF nei roditori e nell'uomo, indica che cinque diversi recettori (sst_{1-5}), codificati da cinque differenti geni,

sono alla base delle azioni biologiche del peptide. Tali recettori sono stati clonati e caratterizzati; essi condividono la stessa struttura generale ma con diversa affinità per gli agonisti sintetici (Ferjoux et al., 2000). I recettori della SRIF appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G; essi sono formati da una singola catena glicoproteica con un dominio N-terminale extracellulare, 7 segmenti idrofobici transmembrana, 3 loops extracellulari e un dominio C-terminale intracellulare. All'interno della specie, essi presentano una omologia di sequenza del 39-60 %; gran parte degli amminoacidi comuni appartengono al dominio transmembrana (Msaouel et al., 2009).

L'attivazione dei recettori da parte della SRIF è accoppiata a molteplici vie di segnalazione intracellulare. Tutti i recettori sono accoppiati alla inibizione della adenilato ciclasi, ma è stato osservato che i singoli recettori sono anche in grado di modulare la via della fosfolipasi C, la via dell'ossido nitrico, la via della fosfolipasi A₂, la via delle MAP chinasi, l'attività di varie fosfoproteine fosfatasi, l'apertura di canali al Ca²⁺ e di canali al K⁺ (Cervia and Bagnoli, 2007).

Sia la SRIF-14 che la SRIF-28 riconoscono i cinque recettori con simile affinità, tranne sst₅ a cui la SRIF-28 si lega con una affinità dieci volte maggiore rispetto alla SRIF-14. Tuttavia, come già accennato, sono stati sviluppati analoghi della SRIF che mostrano affinità selettiva per uno o più recettori. Per esempio l'octreotide, il vapreotide e il lanreotide sono agonisti selettivi per i recettori sst₂/sst₃/sst₅, anche se con una affinità sensibilmente maggiore nei confronti di sst₂, mentre il CH-275 è un agonista selettivo per sst₁ (Hannon et al., 2002).

Tutti e cinque i recettori per la somatostatina sono stati identificati nel SNC, nelle ghiandole endocrine e in quelle esocrine. L'espressione di mRNA per i cinque recettori clonati si sovrappone, ma il loro profilo di espressione è tessuto- e cellulo-specifico (Patel YC, 1999).

Nella retina, i recettori più rappresentati risultano essere sst_1 , sst_2 e sst_4 , mentre sst_3 e sst_5 sono espressi soltanto ad un livello inferiore rispetto agli altri recettori e la loro presenza in distinte popolazioni neuronali, suggerisce varie funzioni per questi recettori (Casini et al., 2005). Per esempio, l'attivazione di sst_2 influenza i livelli di glutammato (il neurotrasmettitore eccitatorio responsabile del trasferimento delle informazioni visive dai fotorecettori, alle cellule bipolari, alle cellule ganglionari da cui prende origine il nervo ottico) sia direttamente che indirettamente, attraverso la regolazione di altri sistemi di neurotrasmissione presenti nella retina, come quelli della dopamina o dell'ossido nitrico (Casini et al., 2005). Per lo studio della funzione dei recettori, di particolare interesse è risultato lo studio dell'espressione retinica della SRIF e dei suoi recettori in topi knock out (KO) per i recettori sst_1 o sst_2 . E' stato infatti osservato che nei topi in cui sia stata deleta l'espressione del recettore sst_1 si ha una overespressione sia della SRIF che di sst_2 , mentre nei topi sst_2 KO sia ha una ridotta espressione della SRIF ed un aumento dell'espressione di sst_1 (Dal Monte et al., 2003; Casini et al., 2004). In particolare, nei topi sst_1 KO l'aumento dell'espressione di sst_2 porta anche un aumento della funzionalità di questo recettore (Bigiani et al., 2004; Pavan et al., 2004; Dal Monte et al., 2009, 2007;), rendendo il modello un sistema unico per lo studio delle funzioni di sst_2 nella retina.

L'interesse particolare per lo studio delle funzioni di sst_2 nella retina è legato al fatto che già da anni è stato osservato come in modelli animali di retinopatia proliferativa ed in pazienti affetti da PDR il trattamento con octreotide, analogo della SRIF con attività agonistica a livello di sst_2 , abbia effetti migliorativi nei confronti della malattia. I risultati ottenuti su piccoli campioni di pazienti affetti da PDR hanno indotto la comunità scientifica a produrre due distinti trials clinici, svolti su oltre 1000 pazienti e conclusi nel 2007 con risultati controversi: nel complesso, all'octreotide non può essere imputato un effetto benefico certo,

tuttavia buoni risultati riguardo l'efficacia di questo analogo sono stati ottenuti in pazienti affetti da PDR in stadio avanzato e con danneggiamento visivo (Palii et al., 2007). Questo risultato ha quindi portato nuove speranze in merito all'efficacia degli analoghi della SRIF nel trattamento dei fenomeni di neovascolarizzazione.

Maggiori conoscenze sull'effetto dell'octreotide nei confronti della neovascolarizzazione, derivano dallo studio di modelli animali. Effetti migliorativi del trattamento con octreotide nei confronti della neovascolarizzazione, con una contemporanea riduzione dei livelli di VEGF, sono stati recentemente dimostrati in un modello di ipertensione portale nel ratto (Mejias et al., 2008; Aydede et al., 2009). Per quanto riguarda la retina, ci sono indicazioni che gli agonisti di ss_{t2} , incluso l'octreotide, inibiscono il processo di neovascolarizzazione nel modello OIR (Higgins et al., 2002; Wilkinson-Berka et al., 2007; Palii et al., 2008). In questo modello, il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che la gravità della risposta angiogenica all'ipossia è correlata con il livello di espressione di ss_{t2} nella retina (Dal Monte et al., 2007). La perdita di ss_{t2} , nei topi ss_{t2} KO, è associata a più severi effetti dell'ipossia sia sulla neovascolarizzazione prodotta nella retina che sui livelli di fattori proangiogenici prodotti dalla retina in risposta allo stato ipossico, inclusi il VEGF e i suoi recettori. Al contrario, l'aumento di espressione di ss_{t2} che si ha nelle retine di topi ss_{t1} KO riduce gli effetti dell'ipossia sulla produzione di fattori proangiogenici. Più recentemente, attraverso l'uso dell'octreotide e dell'antagonista selettivo D-Tyr⁸ cyanamid 154806 (CYN), abbiamo osservato che ss_{t2} media gli effetti antiangiogenici della SRIF e che tali effetti coinvolgono una riduzione dei livelli di espressione del VEGF nella retina (Dal Monte et al., 2009).

Benché sia quindi chiaro, sia dagli studi del nostro gruppo di ricerca, sia dagli altri studi sopra menzionati, che gli analoghi della SRIF in grado di attivare ssr_2 alterino l'espressione del VEGF nel modello OIR, non si hanno informazioni certe sulla localizzazione ove l'interazione fra ssr_2 e VEGF abbia luogo. La spiegazione più semplice per come la stimolazione di ssr_2 possa legarsi ad una riduzione dei livelli di VEGF e della proliferazione dei vasi retinici è quella di assumere che ssr_2 sia espresso dalle cellule endoteliali della retina e che l'interazione con il VEGF abbia luogo in queste cellule. D'altra parte, studi di localizzazione di ssr_2 nella retina di topo non ne riportano l'espressione a livello dei capillari (Cristiani et al., 2002) e lo stesso dicasi per le retine degli altri mammiferi (Bagnoli et al., 2003), benché ci siano evidenze del fatto che ssr_2 sia localizzato sui vasi retinici nella retina umana (Lambooij et al., 2000; Klisovic et al., 2001). D'altronde, studi su cellule endoteliali provenienti dalla vena ombelicale umana hanno mostrato che ssr_2 viene espresso alle cellule endoteliali in proliferazione ma non da quelle quiescenti (Adams et al., 2005), suggerendo che l'espressione di questo recettore possa aumentare nei capillari retinici in condizioni ipossiche.

Nonostante le crescenti evidenze che gli agonisti di ssr_2 possano esercitare una attività angiointibitoria nella retina, un'altra informazione carente è quella relativa alle possibili vie che legano l'attivazione di ssr_2 all'inibizione della risposta angiogenica o alla modulazione dei livelli di VEGF. Come più sopra riportato, è stato recentemente osservato come STAT3 sia critico nell'induzione del VEGF (Chen and Han, 2008), indicando un ruolo per questo fattore di trascrizione nella regolazione della risposta angiogenica all'insulto derivante dall'ipossia. Infatti, è stato dimostrato che nel modello OIR, sia i livelli proteici di STAT3 che della sua forma attiva fosforilata, pSTAT3, aumentano nella retina neovascolarizzata,

con pSTAT3 preferenzialmente localizzato a livello dei vasi neoformati (Mechoulam and Pierce, 2005).

Scopo della tesi

La tesi è stata svolta all'interno di un progetto di ricerca che ha coinvolto sia il gruppo di ricerca dell'Università di Pisa presso cui ho effettuato l'internato di tesi, sia un gruppo di ricerca dell'Università della Tuscia (che ha svolto la parte di indagine immunostochimica) che uno dell'INSERM di Parigi (presso cui sono stati condotti i saggi di binding radioattivo).

Come riportato nell'introduzione, grazie all'uso sia di topi geneticamente modificati che di analoghi selettivi della SRIF, è stato dimostrato che in un modello di retinopatia indotta da ossigeno (OIR) realizzato nel topo, l'attivazione del recettore ss_2 determina una riduzione della neovascolarizzazione retinica attraverso una riduzione dei livelli di VEGF espressi nella retina. Ciò che non è noto è dove l'interazione fra ss_2 e VEGF abbia luogo né quale via di traduzione legghi l'attivazione di ss_2 alla ridotta espressione del VEGF. Poiché l'ipotesi di partenza, basata su evidenze descritte in letteratura, era che tale interazione avvenisse a livello delle cellule endoteliali della retina e coinvolgesse il fattore di trascrizione STAT3, scopo del lavoro è stato quello di dimostrare tali premesse. Inoltre, dato che è noto dalla letteratura che in topi geneticamente modificati la scomparsa di espressione di ss_2 è accompagnata da una ridotta espressione della SRIF mentre un incremento di espressione di ss_2 comporta un aumento anche dei livelli della SRIF, è stato valutato se anche i livelli della SRIF fossero alterati in condizioni di ipossia.

Lo studio ha previsto l'utilizzo di un modello murino di OIR che verrà descritto nella sezione Materiali e Metodi. Le tecniche utilizzate sono state quelle della real time RT-PCR, del Western blot, della immunostochimica, del binding autoradiografico, del RIA.

PROTOCOLLO SPERIMENTALE

CAPITOLO 6

Materiali e metodi

6.1 Materiali

L'octreotide è stato acquistato da NeoMPS (Strasburgo, Francia).

La iQ Syber Green Supermix è stata acquistata da Bio-Rad (Hercules, CA).

I primers sono stati sintetizzati da Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Germania).

Il GelStar è stato acquistato da Cambrex (East Rutherford, NJ).

LTT-SRIF-28 e Tyr³-octreotide sono stati ottenuti rispettivamente dalla Peninsula (Meyerside, UK) e dalla Gen Script Corporation (Piscataway, NJ).

L'anticorpo policlonale di coniglio diretto contro sst_{2A} è stato ottenuto da Gramsch Laboratories (Schwabhausen, Germania).

L'anticorpo monoclonale di topo diretto contro CD31 è stato acquistato da BD Pharmingen (San Diego, CA).

L'anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la tirosina idrossilasi è stato ottenuto da Chemicon (Temecula, CA).

Gli anticorpi secondari coniugati a sonde fluorescenti utilizzati negli esperimenti di immunoistochimica sono stati ottenuti da Molecular Probes (Eugene, OR).

L'anticorpo policlonale di coniglio diretto contro STAT3 e l'anticorpo monoclonale di topo diretto contro pSTAT3 sono stati ottenuti da Santa Cruz Biotechnologie (Santa Cruz, CA).

I reagenti per lo sviluppo in chemiluminescenza dei blots sono stati acquistati da Millipore (Bedford, MA).

Tutti gli altri prodotti chimici sono stati ottenuti da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

6.2 Metodi

6.2.1 Modello di Retinopatia indotta da ossigeno

Gli esperimenti sono stati eseguiti su topi (C57BL/6) di entrambi i sessi sacrificati al 17° giorno dopo la nascita (PD17). In alcuni esperimenti, sono stati utilizzati anche topi a PD12 e PD14. Gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con la Dichiarazione ARVO riguardo l'uso degli animali per la ricerca oftalmica e in accordo con le leggi italiana ed europea sul rispetto degli animali (N° 116/1992 e EEC/609/86). E' stata utilizzata ogni accortezza possibile per ridurre al massimo il numero di animali utilizzati.

Per questi studi è stato utilizzato un modello tipico di OIR (Smith LEH, Wesolowski E, McLellan A, et al. 1994) in cui cuccioli di topi, assieme alle madri che li allattavano, sono stati posti in un incubatore con elevate concentrazioni di ossigeno ($75\% \pm 2\%$) tra PD7 e PD12. Tale periodo di iperossia è seguito poi da un periodo di 5 giorni (PD12-PD17) in cui i cuccioli e la madre sono riportati in condizioni normossiche, che vengono avvertite come condizioni di ipossia relativa. L'ossigeno è stato controllato due volte al giorno con un analizzatore di ossigeno (Miniox I; Bertocchi Srl Elettromedicali, Cremona, Italia). Singole cucciolate sono state fatte crescere sia in ipossia che in normossia. Oltre ai topi normossici, negli esperimenti di farmacologia sono stati utilizzati come controlli sia topi allevati in ipossia e non trattati con i farmaci, sia topi allevati in ipossia e trattati con la soluzione in cui erano stati disciolti i

farmaci. Gli animali sono stati trattati con iniezioni per 5 giorni tra PD12 e PD16, quindi sacrificati a PD17. L'anestesia è stata effettuata per mezzo di iniezioni di Avertin (1.2% tribromoetano e 2.4% amilene idrato in acqua distillata, in una quantità pari a 0.02 ml/g di peso corporeo). Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti alla stessa ora del giorno per escludere possibili influenze circadiane. I dati sono stati raccolti sia da maschi che da femmine dato che dai risultati combinati non era osservabile alcuna differenza apparente tra i sessi.

6.2.2 Somministrazione di analoghi della SRIF

L'agonista preferenziale octreotide e l'antagonista selettivo CYN sono stati somministrati 2 volte al giorno per via sottocutanea da PD12 a PD16 ad una concentrazione pari a 0.02 mg kg⁻¹ dose⁻¹ (octreotide) o a 0.5 mg kg⁻¹ dose⁻¹ (CYN), dosi selezionate in precedenza sullo stesso modello (Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M, Bagnoli P., 2009). Gli analoghi sono stati sciolti in tampone in acetato 33 mM (pH 5) contenente NaCl 135 mM. Iniezioni di solo tampone sono state usate come controllo.

6.2.3 Isolamento dell'RNA retinico e preparazione del cDNA

Dopo che l'animale è stato sacrificato, gli occhi del topo sono stati rapidamente rimossi e le retine sono state dissezionate, immediatamente congelate in azoto liquido e conservate a -80°C. L'RNA totale è stato estratto (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA), secondo le istruzioni del produttore. Le retine sono state poste in 600 µl di tampone RLT e l'estratto è stato centrifugato per 5 min a 20000 g. Il surnatante è stato unito ad un uguale volume di etanolo al 70% e caricato su colonna RNeasy per essere sottoposto a centrifugazione per 1 min a

10000 g. L'eluato è stato scartato e la colonna lavata in sequenza con 700 µl di tampone RW1, 500 µl di tampone RPE e, di nuovo, 500 µl di tampone RPE, ogni volta sottoponendo a centrifugazione e scartando l'eluato. Infine, l'RNA legato alla colonna è stato fluito con 40 µl di acqua RNase-free. L'RNA purificato è stato quindi quantificato allo spettrofotometro (SmartSpec 3000; Bio-Rad). Il cDNA è stato generato da 1 µg di RNA totale (QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen). Per eliminare ogni possibile contaminazione da DNA genomico, l'RNA è stato trattato con 2 µl di gDNA wipeout buffer in un volume totale di 14 µl per 2 min a 42°C. Al campione, rapidamente raffreddato in ghiaccio sono stati quindi uniti 4 µl di tampone di trascrizione, 1 µl di miscela di primer e 1 µl di trascrittasi inversa. Il campione è stato quindi tenuto per 15 min a 42°C, quindi posto per 3 min a 95°C per inattivare la trascrittasi inversa. Campioni di cDNA sono stati aliquotati e conservati a -20°C.

6.2.4 RT-PCR quantitativa

La Real-time RT-PCR quantitativa (qPCR) è stata eseguita utilizzando come fluoroforo il SYBR Green (Bio-Rad) su uno strumento MiniOpticon Two-Color Real-time PCR detection system (Bio-Rad). I primers per la SRIF sono stati disegnati utilizzando il software Primer3, mentre la sequenza per la coppia di primer per Rpl13a è stata ottenuta dalla banca dati RTPrimerDB. I primers forward e reverse sono stati scelti per ibridarsi in maniera specifica alla sequenza genica appropriata (SRIF forward: CCCCAGACTCCGTCAGTTTCT, reverse: TCTCTGTCTGGTTGGGCTCG; Rpl13a forward: CACTCTGGAGGAGAAACGGAAGG, reverse: GCAGGCATGAGGCAAACAGTC). L'efficienza dell'amplificazione era vicino al 100% per entrambe le coppie di primer come calcolato con il software Opticon

Monitor 3 (Bio-Rad). Le reazioni di PCR includevano 1 µl di cDNA, 300 nM di ciascun primer, 7.5 µl di mastermix (iQ SYBR Green Supermix; Bio-Rad), e acqua RNasi-free per portare il volume finale di reazione a 15 µl. L'espressione del gene della SRIF è stata misurata contemporaneamente a quella del gene per Rpl13a, un gene di controllo costitutivamente espresso. Le reazioni di controllo sono state allestite come appena descritto, ma con acqua al posto del cDNA oppure con campioni di RNA non sottoposti a retrotrascrizione. Tutte le reazioni sono state eseguite in triplicato. La qPCR è stata eseguita con uno step iniziale di denaturazione a 95°C per 3 minuti, e successivamente con 40 cicli a 95°C per 10s e 58°C per 20s. La fluorescenza è stata letta durante la reazione, permettendo un monitoraggio continuo della quantità di prodotto di PCR. Dopo l'amplificazione, l'analisi della curva di melting è stata usata per confermare che il segnale corrispondeva ad un amplicone unico. I prodotti della qPCR sono stati analizzati su gel al 3% di agarosio colorato con GelStar, per verificare che le dimensioni del prodotto fossero quelle attese. Il livello di espressione dei prodotti di PCR è stato valutato applicando il metodo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen, 2001). L'aumento o la diminuzione sono stati valutati rispetto ad un opportuno controllo dopo la normalizzazione rispetto a RPL13a. Dopo l'analisi statistica, i dati provenienti dai differenti esperimenti sono stati riportati e mediati nello stesso grafico. I dati sono espressi come media \pm SE e provengono da 4 diversi campioni. Ogni campione si riferisce all'mRNA estratto da 3 retine.

6.2.5 Misurazione dei livelli di SRIF con saggio RIA

Dopo il sacrificio dei topi, le retine sono state dissezionate e omogenizzate con 10 volumi di acido acetico 2N rispetto al loro peso. Aliquote di 10 µl per ogni omogenato sono state prelevate per determinare il contenuto totale di proteine

con il metodo di Bradford (Bradford, 1976). L'omogenato è stato fatto bollire per 10 min, in modo tale da rendere inattive le peptidasi endogene ed infine centrifugato per 10 min a 30.000 g, ad una temperatura di 4°C. Il sovranatante così ottenuto è stato poi liofilizzato e mantenuto ad una temperatura di -80°C. Il giorno dell'esperimento, i campioni sono stati nuovamente risospesi in tampone ed i livelli di SRIF sono stati quantificati con un saggio RIA (Grouselle et al., 1998). Come ligando è stata utilizzata Tyr⁰-SRIF-14 iodinata (Peninsula). Gli anticorpi policlonali di coniglio diretti contro la SRIF sono stati prodotti all'INSERM di Parigi. I campioni o concentrazioni standard della SRIF (queste ultime per l'allestimento di una curva di taratura) sono stati incubati con gli anticorpi (diluizione finale 1:60000) per 24 h a 4°C. La [¹²⁵I]Tyr⁰-SRIF-14 è stata quindi aggiunta per un periodo di ulteriori 24 h. La separazione del complesso dal ligando libero è stata eseguita per centrifugazione, usando IgG prodotte contro il coniglio (diluizione finale 1:600; Byosis, Compiegne, France). I risultati dell'esperimento RIA sono stati normalizzati facendo riferimento alla quantità di proteine della retina e sono stati espressi come media ± SE. Ogni misurazione è stata effettuata su 6 distinti campioni.

6.2.6 Autoradiografia

Per l'autoradiografia del recettore sst₂ la LTT-SRIF-28 e il Tyr³-octreotide sono stati iodinati secondo un protocollo ben descritto in letteratura (Moyse et al., 1992); le loro attività specifiche sono risultate, rispettivamente, 422 Ci/mmol e 662 Ci/mmol. Gli occhi di 3 topi del gruppo di controllo normossico e di 3 topi sottoposti ad ipossia sono stati enucleati e rapidamente congelati in azoto liquido prima di essere conservati a -80°C. Gli occhi sono stati orientati in modo tale da ottenere delle sezioni parallele all'asse ottico. Le sezioni (16 µm) sono state

realizzate su di un criostato ad una temperatura di -17°C , montate su vetrini, gelatinati ed infine conservate a -20°C fino all'uso. L'autoradiografia è stata condotta in accordo con quanto descritto in letteratura (Dal Monte et al., 2003). Dopo 20 min di preincubazione in un tampone Tris-HCl 50 mM (pH 7.4), contenente EGTA 2 mM, MgCl_2 5 mM, bacitracina 0.1 mM e BSA allo 0.2% a temperatura ambiente (RT), le sezioni sono state incubate per 2 ore a RT nella stessa soluzione, con un'aggiunta di $[^{125}\text{I}]\text{LTT-SRIF-28}$ 545 pM o $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3\text{-octreotide}$ 260 pM. Il binding non specifico è stato determinato in una serie di vetrini adiacenti incubati in presenza di SRIF-14 $1\mu\text{M}$. Il lavaggio delle sezioni è stato effettuato come segue: ad una breve immersione in acqua bi distillata (dd.) fredda hanno fatto seguito due lavaggi di 10 min nel precedente tampone ed un'immersione in acqua dd fredda per rimuovere i sali; infine, le sezioni sono state lasciate asciugare all'aria. Gli autoradiogrammi sono stati generati per apposizione delle sezioni sottili alle pellicole (BioMax MR, Kodak, Rochester, NY), ad una temperatura di 4°C , per una durata di 3 giorni. Le fotomicrografie delle pellicole sono state realizzate ed analizzate facendo ricorso ad un sistema di analisi computerizzata dell'immagine, con il software Mercator (BIOCOM; Explora Nova-Mercator, La Rochelle, France). La quantificazione autoradiografica è stata espressa in pmol/unità di superficie della retina. Il legame specifico è stato espresso in pmol/unità di superficie della retina calcolata per il legame totale - in pmol/unità di superficie della retina calcolata per il legame non specifico. I dati sono riportati come media \pm SE e sono stati ottenuti da 6 retine per entrambi i gruppi.

6.2.7 Western Blotting

L'analisi con Western Blot è stata condotta su proteine estratte da 3 campioni diversi per ogni condizione sperimentale, ciascuno contenente 5 retine. In sintesi, le retine sono state omogenizzate in Tris-HCl 10 mM (pH 7.6), contenente EDTA 5 mM, EGTA 3 mM, saccarosio 250 mM, fenilmetilsulfonilfluoruro 1 mM, peptistatina 1 μ M, leupeptina 10 μ g/mL, aprotinina 2 μ g/mL, sodio ortovanadato 0.1 mM, beta-glicerolfosfato 20 mM e p-nitrofenilfosfato 20 mM (tampone A), e centrifugate a 22.000 g per 30 min a 4°C. Il surnatante è stato utilizzato per la valutazione di STAT3 e di pSTAT3. In seguito, il pellet è stato risospeso nel tampone B (HEPES 20 mM a pH 7.4, contenente NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, EGTA 3 mM, 4 mg di n-dodecil-beta-maltoside e gli inibitori delle proteasi presenti nel tampone A), e centrifugato a 22.000 g per 30 min ad una temperatura di 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato usato per la valutazione di sst_{2A}. La concentrazione delle proteine è stata determinata secondo Bradford (Bradford, 1976). Le aliquote di ogni campione, contenenti uguali quantità di proteine, sono state sottoposte a SDS-PAGE (Laemmli, 1970). La β -actina è stata usata come controllo. I gel sono stati trasferiti su membrana di polivinilidene difluoruro e la membrana è stata bloccata per 1 h a RT con latte al 3%. Le membrane sono poi state incubate per tutta la notte a 4°C con anticorpi policlonali di coniglio diretti contro STAT3 (diluzione 1:200) o contro sst_{2A} (diluzione 1:500), o con anticorpi monoclonali di topo diretti contro pSTAT3 (diluz. 1:200) o contro la β -actina (dil. 1:2500). Infine, le membrane sono state incubate per 1 h a RT, con un anticorpo secondario di topo diretto contro le IgG di coniglio coniugato con la perossidasi di rafano (diluzione 1:5000), o con un anticorpo secondario di coniglio diretto contro le IgG di topo coniugato con la

perossidasi di rafano (diluzione 1:25000), e sviluppati in chemiluminescenza, sottoponendo le membrane a stripping tra un esperimento e l'altro.

La densità ottica (OD) delle bande è stata valutata utilizzando il software Quantity One (Bio-Rad). I dati sono stati normalizzati sulla base del livello della β -actina. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in doppio. Dopo l'analisi statistica, i dati raccolti dai differenti esperimenti sono stati mediati e riportati su uno stesso grafico.

6.2.8 Immunoistochimica

Gli occhi dei topi sono stati rimossi e fissati per 1 h in paraformaldeide al 4 % in tampone fosfato 0.1 M, pH 7.4 (PB). Gli occhi così fissati sono stati trasferiti in saccarosio al 25% in PB e conservati a 4°C. Sezioni di retina dello spessore di 10 μ m sono state tagliate con un criostato, perpendicolarmente alla superficie del corpo vitreo, poi poste su vetrini gelatinati e conservate a -20°C. L'antisiero di coniglio diretto contro sst_{2A} è stato impiegato ad una diluzione di 1:500. L'anticorpo monoclonale di ratto, diretto contro il marker delle cellule endoteliali CD31, è stato impiegato ad una diluzione di 1:200. L'anticorpo monoclonale di topo diretto contro la PKC, marker delle cellule bipolari dei bastoncelli, è stato usato ad una diluzione di 1:200. L'anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la TH, marker delle cellule amacrine, è stato usato ad una diluzione di 1:400. Le sezioni sono state lavate in PB ed incubate per tutta la notte a 4°C con un anticorpo primario diluito in PB contenente Triton X-100 allo 0.5%. Dopo i lavaggi effettuati con PB, le sezioni sono state incubate 1 h a RT con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488 oppure Alexa Fluor 546, alla diluzione di 1:200 in PB contenente Triton X-100 allo 0.5 %. Infine, i vetrini sono stati posti in una miscela di glicerina e PB. Gli esperimenti

di controllo includevano l'omissione degli anticorpi primari. Non è stata osservata alcuna colorazione aspecifica. Negli studi con doppia marcatura gli esperimenti di controllo sono stati anche realizzati in maniera tale da assicurare che gli anticorpi primari non subissero una reazione incrociata quando venivano mischiati assieme e che gli anticorpi secondari reagissero solo coi complessi anticorpo-antigene appropriati. Le immagini di immunofluorescenza sono state acquisite adoperando un obiettivo Zeiss Neofluar-plan 40x, una fotocamera AxioCam ed un software Zeiss Axiovision 4 (Carl Zeiss Vision GmbH, Germania). Le dimensioni delle immagini digitali sono state adattate ed ottimizzate per contrasto e luminosità utilizzando Adobe Photoshop (Adobe systems, California). Le immagini finali sono state salvate con una risoluzione minima di 300 dpi. L'analisi quantitativa delle sezioni retiniche con doppia marcatura è stata realizzata in accordo con Catalani et al. (2007). In sintesi, sia per CD31 che per sst_{2A}, sono state visualizzate le immagini immunoreattive relative allo stesso campo. Le immagini sono state quindi convertite in scala di grigi, normalizzate rispetto al fondo e la loro soglia è stata regolata per avere immagini bianche su sfondo nero. Utilizzando il software KS-300 (Carl Zeiss), sono state calcolate l'area di immunocolorazione del CD31 e quella di immunoreattività (IR) di sst_{2A}. Per finire, è stato calcolato il rapporto tra l'area coperta da sst_{2A} e quella coperta dal CD31 e tale rapporto è stato usato come indice della sovrapposizione delle due aree (overlap area). I dati sono stati espressi come media \pm SE e traggono la loro origine da 6 retine per ciascun gruppo.

6.2.9 Analisi statistica

Tutti i dati sono stati analizzati col test di Kolmogorov-Smirnov per la verifica

della distribuzione normale dei valori. La significatività statistica è stata sottoposta a valutazione con l'unpaired Student's *t*-test oppure con ANOVA, seguito Newman-Keuls post test. I risultati sono stati espressi come media \pm SE dei valori *n* indicati (Prism, Graphpad software, San Diego, California). Le differenze con $P < 0.05$ sono state considerate significative.

CAPITOLO 7

Risultati

7.1 Effetti dell'ipossia sulla SRIF

Come mostrato in figura 7a, la qPCR fornisce prodotti di amplificazione a 110 bp, corrispondenti all'mRNA della SRIF. Cinque giorni di normossia dopo iperossia (ipossia relativa) non influenzano la quantità dell'mRNA della SRIF, i cui livelli sono simili a quelli delle retine di controllo (Figura 7b). Al contrario, come mostrato in figura 1c, i livelli di SRIF misurati con saggio RIA sono significativamente ridotti dall'ipossia (~ 65% inferiori rispetto a quelli misurati nelle retine di controllo; $P < 0.05$).

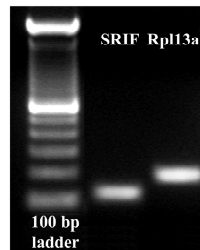
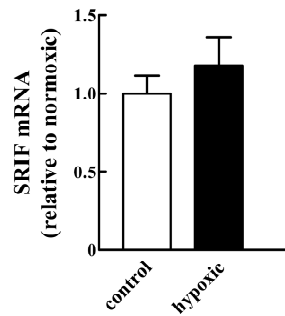
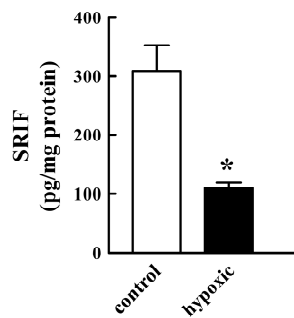
A**B****C**

Figura 7. Livelli retinici della SRIF in topi ipossici. **(A)** Prodotti ottenuti dalla qPCR effettuata sull'mRNA della SRIF (110 bp) e sul gene housekeeping Rpl13a (182 bp) in retine di controllo normossiche. **(B)** mRNA della SRIF nei controlli (*bianco*) e in condizioni ipossiche (*nero*). La valutazione della qPCR mostra che l'mRNA della SRIF non è stato influenzato dall'ipossia. I dati sono stati analizzati applicando la formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ utilizzando Rpl13a come standard interno. Ogni colonna rappresenta la media \pm SE dei risultati di 4 campioni. Ogni campione si riferisce all'mRNA estratto da 3 retine. **(C)** Livello endogeno di SRIF nelle retine di controllo (*bianco*) e in quelle ipossiche (*nero*). Le

misurazioni con RIA mostrano che il livello della SRIF è ridotto dall'ipossia (* $P < 0.05$ rispetto al controllo; unpaired Student's t -test). La quantità della SRIF è espressa in pg/mg di proteine totali. Ogni colonna rappresenta la media \pm SE dei dati ottenuti da 6 retine.

7.2 Effetti dell'ipossia sulla capacità di binding di sst₂ e sull'espressione di sst_{2A}

I dati riassunti nella tabella 1 mostrano alti livelli di siti di legame per la SRIF nella retina di topo poiché le concentrazioni di radioligandi utilizzati (vedi materiali e metodi) sono state nell'ordine del picomolare. Il legame non specifico risulta basso per entrambe i radioligandi utilizzati. Nelle retine ipossiche i siti di legame per [¹²⁵I]LTT-SRIF-28 non sono significativamente differenti dai rispettivi valori nelle retine di controllo. Al contrario, i siti di legame per il [¹²⁵I]Tyr³-octreotide risultano significativamente diminuiti di circa il 30% (Figura 8, tabella 1).

Tabella 1. Analisi autoradiografica dei siti di legame della SRIF sia nelle retine di controllo che in quelle ipossiche.

Radioligand	Specific binding	
	control	hypoxic
[¹²⁵ I]LTT-SRIF-28	3.91 \pm 0.16	3.67 \pm 0.28
[¹²⁵ I]Tyr ³ -octreotide	3.51 \pm 0.26	2.83 \pm 0.08*

I dati sono espressi come legame specifico (pmol/unità di superficie della retina calcolata per il legame totale - pmol/unità di superficie della retina calcolata per il legame non specifico) \pm SE di 12-17 sezioni coronali. * $P < 0.05$ rispetto al rispettivo controllo (unpaired Student's t -test).

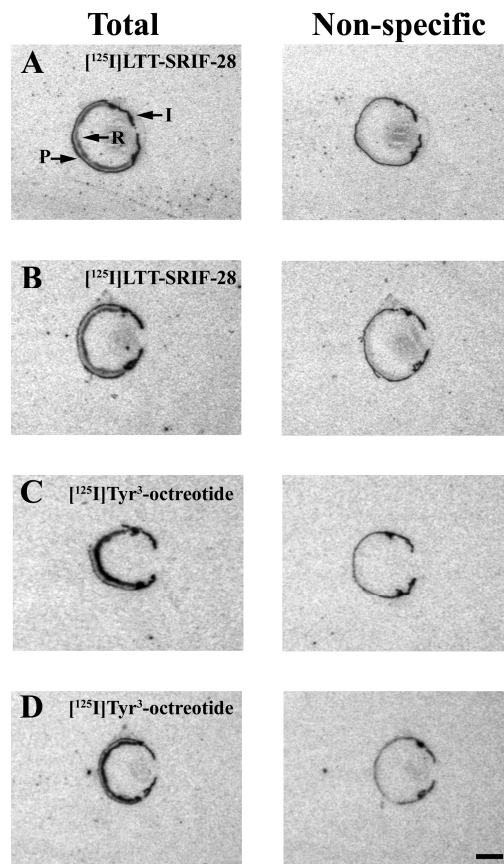


Figura 8. Fotomicrografie rappresentative del segnale autoradiografico dei siti di legame marcati con $[^{125}\text{I}]\text{LTT-SRIF-28}$ (A-B) e $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3\text{-octreotide}$ (C-D) in sezioni coronali di occhi di topi di controllo (A, C) e mantenuti in condizioni di ipossia (B, D). Totale e non-specifico si riferiscono a sezioni sequenziali che derivano dallo stesso occhio. Da notare che l'ipossia causa una diminuzione dei siti di legame marcati con $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^3\text{-octreotide}$. I: iride, P: occhio posteriore (sclera, coroide), R: retina. Barra di calibrazione: 1 mm.

Per quanto riguarda i livelli di sst_{2A} , lo Western Blot semiquantitativo mostra che nelle retine ipossiche essi non sono significativamente diversi dai valori misurati nelle retine di controllo, sia a PD12 (fine del periodo di iperossia) che a PD14 (2 giorni di normossia). Al contrario, 5 giorni dopo il termine dell'esposizione a

condizioni di iperossia (ipossia relativa, PD17), i livelli retinici di sst_{2A} sono significativamente più bassi rispetto a quelli presenti nei controlli (circa 26%, $P < 0.05$; Figura 9).

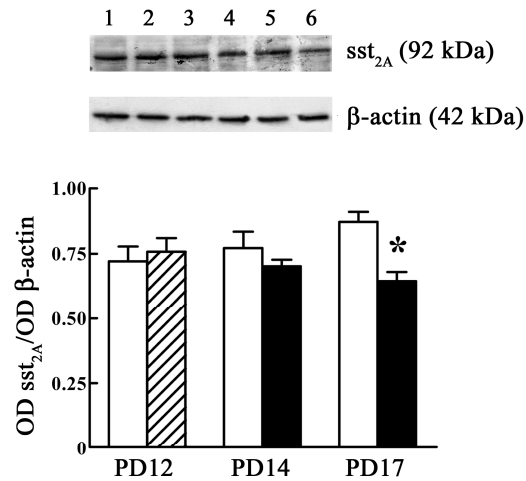


Figura 9. Livelli di sst_{2A} in condizioni normossiche (*bianco*) e ipossiche (*nero*), come valutato nelle retine dei topi per mezzo di Western blot, utilizzando la β -actina come controllo. Le analisi densitometriche dimostrano che i livelli sst_{2A} diminuiscono in condizioni di ipossia a PD17, che corrisponde a 5 giorni di normossia dopo l'iperossia (* $P < 0.05$ rispetto al rispettivo controllo; ANOVA seguita da Newman-Keuls multiple comparison post test). Non sono stati osservati effetti a PD12, che corrisponde alla fine dell'iperossia (*linea tratteggiata*) o a PD 14, che corrisponde a 2 giorni di normossia dopo l'iperossia. Ogni colonna rappresenta la media \pm SE dei dati ottenuti da 3 campioni. Ogni campione si riferisce alle proteine estratte da 5 retine. Gel rappresentativi sono mostrati in figura e numerati progressivamente in corrispondenza dell'istogramma.

7.3 Effetti dell'ipossia sulla localizzazione di sst_{2A}

L'immunolocalizzazione di sst_{2A} nelle retine di controllo è in accordo con le precedenti osservazioni nella retina del topo (Mastrodinou et al., 2006; Casini et al., 2004; Cristiani et al., 2002). In particolare, l'immunoreattività per sst_{2A} è in gran parte localizzata a livello delle cellule bipolari e delle cellule amacrine, mentre è scarsa quella associata ai capillari della retina, contrassegnati dalla marcatura per il CD31 (Figura 10a, c). L'ipossia causa una drastica riduzione dell'immunomarcatura per sst_{2A} nei neuroni retinici, accompagnata da un aumento evidente di immunomarcatura per sst_{2A} nei vasi sanguigni retinici (Fig. 10b, d). La vascolatura retinica include tre strati di reti capillari: lo strato più superficiale dei capillari è situato nella parte interna dello strato di fibre nervose (NFL), i capillari interni che si trovano nello strato delle cellule ganglionari (GCL), e la rete esterna capillare che si estende dallo strato plessiforme interno (IPL) fino allo strato plessiforme esterno (OPL) attraversando lo strato nucleare interno (INL) (Zhang, 1994). Come mostrato in figura 10e, l'area di sovrapposizione coperta dall'immunomarcatura per sst_{2A} e per CD31 è praticamente raddoppiata negli strati IPL-INL delle retine ipossiche rispetto alle retine di controllo. Al contrario, l'ipossia non influenza l'area di sovrapposizione negli strati NFL-GCL.

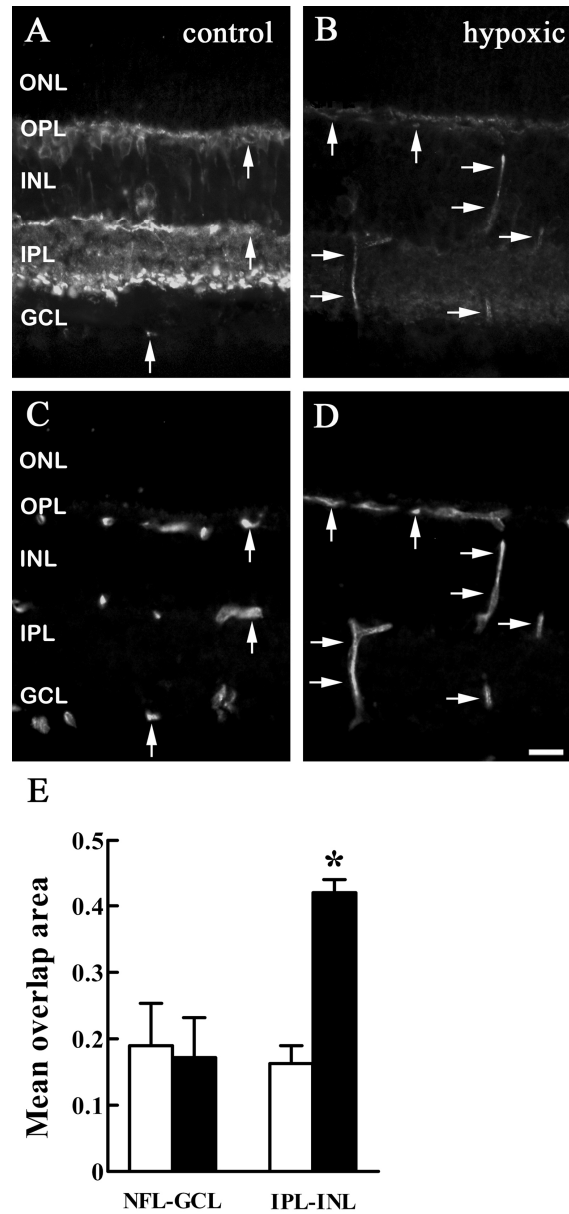


Figura 10. Le sezioni retiniche mostrano il profilo immunoreattivo di cellule e capillari per sst_{2A} (**A, B**) e per CD31 (**C, D**) nelle retine di controllo (**A, C**) e in quelle ipossiche (**B, D**). Le frecce indicano i punti dei vasi retinici doppiamente marcati per sst_{2A} e CD31. Barra di calibrazione: 20 μ m. (**E**) L'area di sovrapposizione media coperta dall'immunoreattività per sst_{2A} e CD31 nei controlli (*bianco*) e in condizioni di ipossia (*nero*). Gli istogrammi mostrano che l'area di sovrapposizione è incrementata negli

strati IPL-INL ma non in quelli NFL-GCL (* $P < 0.001$ rispetto al controllo; unpaired Student's t -test). Ogni istogramma rappresenta la media \pm SE dei dati ottenuti da 6 retine per ciascuna condizione sperimentale. Abbreviazioni: ONL, strato nucleare esterno; OPL, strato plessiforme esterno; INL, strato nucleare interno; IPL, strato plessiforme interno; GCL, strato delle cellule ganglionari; NFL, strato delle fibre nervose.

Sono stati inoltre condotti esperimenti per determinare se la diminuzione della immunomarcatura per ss_{2A} indotta dall'ipossia potesse derivare da alterazioni, anch'esse indotte da ipossia, delle cellule della retina che esprimono ss_{2A} . Nella retina dei roditori, ss_{2A} è localizzato nelle cellule amacrine contenenti TH e nelle cellule bipolari dei bastoncelli che contengono PKC. Come mostrato nella figura 11, l'ipossia non influenza né l'immunomarcatura per TH, né quella per PKC.

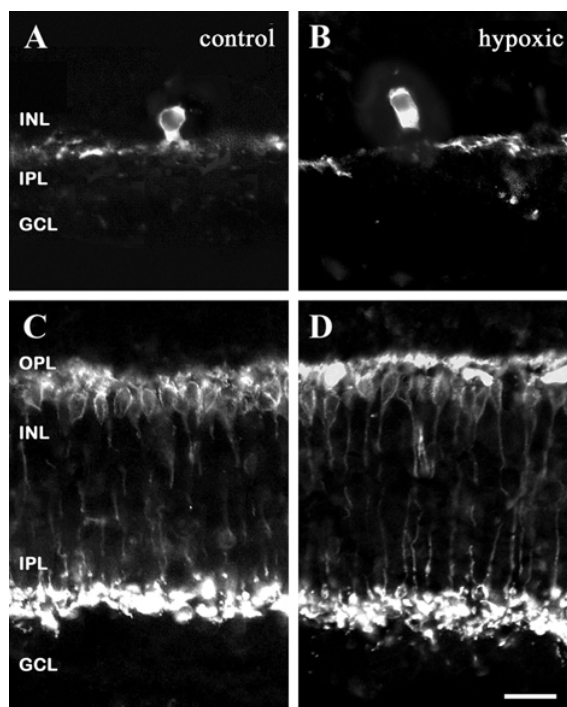


Figura 11. Sezioni retiniche che mostrano immunomarcatura per TH (**A, B**) e PKC (**C, D**) nelle retine di controllo (**A, C**) e in quelle ipossiche (**B, D**). Barra di calibrazione: 20 μ m. Per le abbreviazioni si guardi la Fig. 10.

7.4 Effetti dell'ipossia su STAT3

Come mostrato in figura 12, i livelli di STAT3 sono più che raddoppiati nei campioni ipossici rispetto ai controlli ($P < 0,001$). Allo stesso modo, pSTAT3 aumenta significativamente nelle retine ipossiche rispetto alle retine di controllo (circa 133%, $P < 0,001$). Il trattamento con il solo veicolo non modifica i livelli retinici di STAT3 o di pSTAT3, mentre il trattamento con octreotide diminuisce in modo significativo sia i livelli di STAT3 che quelli di pSTAT3 (circa 28% e 26% rispettivamente, $P < 0,001$) nella retina ipossica. Al contrario, il trattamento

con CYN aumenta significativamente i livelli di pSTAT3 (circa 10%, $P<0.05$), senza influire su quelli di STAT3.

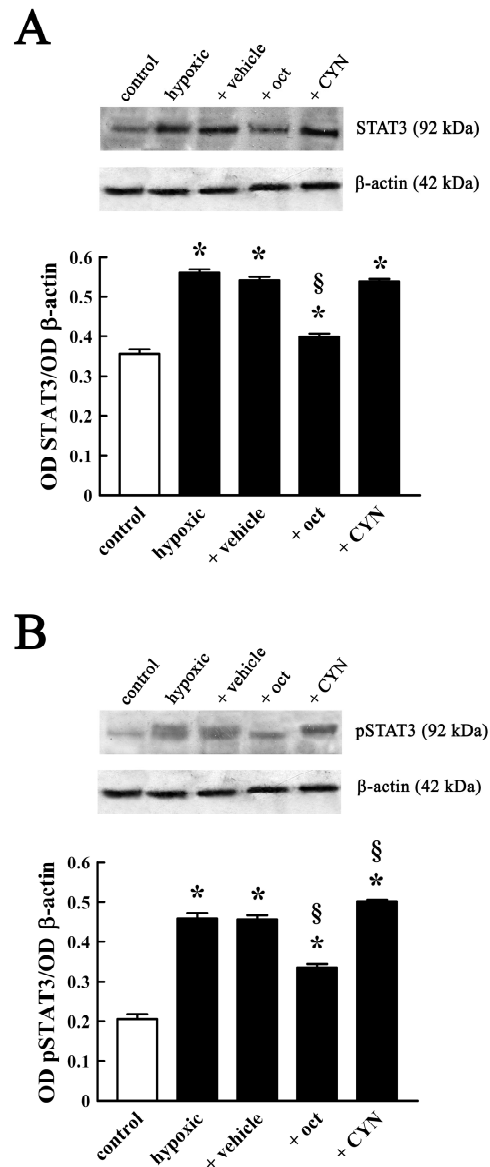


Figura 12. Livelli di STAT3 (A) e di pSTAT3 (B) in retine ipossiche dopo trattamento con 0.02 mg Kg^{-1} di octreotide o 0.5 mg Kg^{-1} di CYN, come valutato mediante Western blot usando la β -actina come

controllo. **(A, B)** L'analisi densitometrica mostra che sia i livelli di STAT3 che di pSTAT3 sono aumentati in seguito ad ipossia (* $P < 0.001$ rispetto al rispettivo controllo; ANOVA seguita da Newman-Keuls multiple comparison post test). Il livello di STAT3 nei topi trattati con veicolo non è significativamente diverso da quello nei topi ipossici. L'incremento di STAT3 e di pSTAT3 indotto da ipossia è significativamente più basso nei campioni trattati con octreotide ($^{§§}P < 0.001$ rispetto al rispettivo trattamento con veicolo; ANOVA seguita da Newman-Keuls multiple comparison post test). L'incremento di STAT-3 indotto da ipossia si mantiene inalterato nei campioni trattati con CYN mentre l'incremento di pSTAT3 indotto da ipossia aumenta ulteriormente nei campioni trattati con CYN ($^{§}P < 0.05$ rispetto al rispettivo trattamento con veicolo; ANOVA seguita da Newman-Keuls multiple comparison post test). Ogni colonna rappresenta la media \pm SE dei dati ottenuti da 3 campioni. Ogni campione si riferisce alle proteine estratte da 5 retine. Sono mostrati gel rappresentativi.

CAPITOLO 8

Discussione e conclusioni

I risultati di questo studio dimostrano per la prima volta che nel modello OIR l'ipossia determina un aumento dell'espressione di 'sst_{2A} nei vasi retinici suggerendo che l'endotelio in proliferazione sovraesprime sst_{2A} e diventi quindi in grado di rispondere efficacemente all'azione angioinibitoria della SRIF. I risultati attuali indicano inoltre che nel modello OIR l'ipossia determina un aumento dell'espressione e dell'attività di STAT3 e portano a pensare che STAT3 svolga un ruolo importante nella mediazione dell'azione di sst₂ nelle retinopatie proliferative.

8.1 Effetti dell'ipossia sulla SRIF

Come visto nella sezione risultati, i livelli retinici della SRIF sono ridotti nel modello OIR. Questo risultato è coerente con una diminuzione dei livelli di SRIF osservati nel vitreo e/o nella retina dei pazienti diabetici (Simó et al., 2002; Hernandez et al., 2005; Carrasco et al., 2007), e suggerisce che il deficit oculare della SRIF possa contribuire alla comparsa della retinopatia diabetica. A questo proposito, gli effetti protettivi della SRIF e dei suoi analoghi sono stati recentemente dimostrati in modelli di roditori con neurodegenerazione della retina (Catalani et al., 2007; Kiagiadaki and Thermos, 2008; Cervia et al., 2008;). Il fatto che, a seguito di ipossia, la SRIF endogena diminuisca nella retina, mentre l'mRNA della SRIF non cambia, suggerisce una regolazione dell'espressione a livello post-trascrizionale. Questa possibilità è in linea con

precedenti risultati che suggeriscono il coinvolgimento di meccanismi post-traduzionali nella regolazione dell'espressione della SRIF nella retina di topi con delezione genetica dei recettori sst_1 o sst_2 (Dal Monte et al., 2003; Casini et al., 2004).

8.2 Effetti dell'ipossia su sst_2

I nostri risultati mostrano che l'ipossia determina una riduzione dei livelli retinici della isoforma sst_{2A} di sst_2 , suggerendo che tale riduzione di sst_{2A} sia associata all'insorgenza di angiogenesi nella retina del modello OIR. Che l'ipossia possa regolare l'espressione di recettori presenti sulla superficie della membrana cellulare è stato dimostrato in diversi modelli sperimentali per i recettori dell'adenosina del sottotipo A_{2A} (Feoktistov et al., 2004), per i recettori oppioidi di tipo delta (Zhu et al., 2009), e per i recettori per i glucocorticoidi (Huang et al., 2009). Tuttavia, non vi sono risultati disponibili che possano riportare una regolazione dei recettori della SRIF indotta dall'ipossia. Come mostrato nella sezione Risultati, la riduzione di sst_{2A} non è accompagnata da cambiamenti nell'espressione genica di sst_2 , come peraltro già osservato (Dal Monte et al., 2007), e ciò indica che tale riduzione sia dovuta all'intervento di meccanismi trascrizionali o post-trascrizionali.

I nostri studi autoradiografici hanno confermato la diminuzione dei livelli di sst_2 nelle retine ipossiche, mostrando una netta diminuzione dei siti di legame di [125 I]Tyr³-octreotide. Anche se il [125 I]Tyr³-octreotide è in grado di legare con alta affinità sia sst_2 che sst_5 (Siehler et al., 1999), il legame osservato è dovuto esclusivamente alla presenza di sst_2 dato che la presenza di sst_5 e di sst_3 , altro recettore cui l'octreotide è in grado di legarsi, è molto scarsa nella retina di topo (Dal Monte et al., 2003). Dato che [125 I]-LTT SRIF-28 è in grado di legarsi con

alta affinità a tutti i recettori della SRIF (Siehler et al., 1999), il fatto che nelle retine di controllo i siti di legame di [¹²⁵I]-LTT SRIF-28 abbiano una densità simile a quella presente nelle retine ipossiche suggerisce che il numero totale di recettori SRIF non cambia come conseguenza all'ipossia, e implica che il calo di sst₂ successivo all'ipossia sia compensato da un aumento dei livelli di altri recettori SRIF. Infatti, nei topi ss₂ KO uno dei principali effetti a livello retinico della perdita di sst₂ è proprio un aumento dei livelli di espressione di sst₁ (Casini et al., 2004).

I meccanismi che portano alla riduzione dei livelli di sst₂ nelle retine ipossiche devono ancora essere chiariti. È probabile che SRIF, sst₁ e sst₂ cooperino in complessi meccanismi di regolazione che controllano le proprie espressioni nella retina. Le nostre osservazioni precedenti indicano una stretta correlazione tra i livelli della SRIF nella retina e l'espressione di sst₂ (Dal Monte et al., 2003; Casini et al., 2004), ma per il momento è difficile stabilire se l'effetto dell'ipossia sui livelli retinici della SRIF possa, a sua volta, influenzare l'espressione di sst₂ o, al contrario, se l'effetto dell'ipossia su sst₂ possa incidere sui livelli della SRIF nella retina. D'altra parte, nella retina del topo, la possibilità che i livelli della SRIF siano regolati da sst₂ sembra improbabile, poiché solo sst₁ è espressa dalle cellule amacrine contenenti SRIF (Cristiani et al., 2000; Dal Monte et al., 2003; Thermos et al., 2006;).

8.3 Cambiamenti dinamici nella localizzazione di sst_{2A} dopo l'ipossia

Gli studi sulla localizzazione dimostrano per la prima volta che l'ipossia induce una drastica riduzione nella immunomarcatura per sst_{2A} nelle cellule della retina. Anche se l'esposizione acuta all'ipossia, come recentemente dimostrato, causa

cambiamenti nelle cellule di Müller e la degenerazione delle cellule nervose nella retina di ratti neonati (Kaur et al., 2009), il fatto che nel nostro modello sperimentale l'ipossia non determini un danno a livello delle cellule che esprimono ss_{2A} , comprese le cellule amacrine e le cellule bipolari (Cristiani et al., 2002), esclude la possibilità che nel modello OIR la riduzione osservata di ss_{2A} possa essere causata da un danno ipossico alle cellule che esprimono il recettore.

Abbiamo osservato che nelle retine ipossiche le cellule endoteliali mostrano immunoreattività per ss_{2A} relativamente elevata, mentre nelle retine normossiche tale immunoreattività è scarsamente associata ai vasi retinici. Questo risultato è in linea con la constatazione che le cellule endoteliali vascolari umane quiescenti non esprimono ss_2 , e questo recettore è espresso quando le cellule endoteliali iniziano a crescere (Watson et al., 2001; Adams et al., 2005). Inoltre, le nostre osservazioni sono in linea anche con gli studi effettuati su occhi umani con neovascolarizzazione coroidale, dove le cellule endoteliali di neoformate esprimono ss_2 (Lambooy et al., 2000). Infine, il profilo di espressione di ss_2 nei pazienti con DR indica che gli effetti benefici degli agonisti di ss_2 possono dipendere dalla presenza di ss_2 sui vasi di nuova formazione (van Hagen et al., 2000). I nostri risultati sull'aumento di espressione di ss_{2A} indotto dall'ipossia nei vasi retinici, suggeriscono come, nell'endotelio in proliferazione, ss_{2A} possa ricevere l'azione angiointibitoria di analoghi della SRIF con alta affinità per ss_2 . Una relazione tra i livelli di ss_2 e l'efficacia dell'octreotide è stata recentemente dimostrata in ratti affetti da ipertensione portale in fase avanzata, in cui si evidenzia una riduzione dei livelli di espressione di ss_2 che può essere responsabile del fallimento della terapia con octreotide per inibire l'angiogenesi (Mejias et al., 2008).

8.4 STAT3 come effettore dell'attivazione di sst₂

Il lavoro del nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che gli effetti angiointibitori della SRIF iniziati dall'attivazione di sst₂ coinvolgono la riduzione dell'espressione del VEGF (Dal Monte et al., 2009). Coerentemente con tali osservazioni, è stato anche dimostrato che l'octreotide è efficace nel ridurre sia la neovascolarizzazione coroidale che i livelli dell'mRNA del VEGF nell'epitelio pigmentato retinico e nel tessuto coroidale dei ratti (Qu et al., 2009). Pertanto, sarebbe importante individuare gli effettori a valle dell'attivazione di sst₂ in modo da creare un legame molecolare tra l'attivazione di tale recettore e la modulazione del VEGF. Molto lavoro è stato fatto per chiarire il ruolo funzionale di fattori di trascrizione che regolano i geni bersaglio coinvolti nell'angiogenesi (DeNiro et al., 2009; Guma et al., 2009; Phng et al., 2009). Fra questi fattori di trascrizione, STAT3 appare di particolare interesse in quanto la sua attivazione sembra essere accoppiata ad una regolazione del VEGF (Niu et al., 2002; Schaefer et al., 2002; Bartoli et al., 2003; Gray et al., 2005; Noman et al., 2009). La presenza di STAT3 è stata rilevata nella retina, anche se il ruolo di tale fattore di trascrizione non è stato interamente compreso (Ozawa et al., 2008; Ueki et al., 2008; Zhang et al., 2008). L'espressione e l'attivazione di STAT3 aumentano nel modello OIR, e pSTAT3, la forma attiva di STAT3, è stata localizzata nei vasi retinici neovascolari (Mechoulam and Pierce, 2005). In linea con questi risultati, abbiamo dimostrato che sia l'espressione di STAT3 che quella di pSTAT3 sono aumentate dall'ipossia, suggerendo in tal modo che STAT3 può mediare la proliferazione di vasi sanguigni nella neovascolarizzazione retinica. Inoltre, abbiamo dimostrato che l'aumento di espressione di STAT3 nella retina ipossica è influenzata dal trattamento con agonisti o antagonisti di sst₂. Infatti, l'aumento indotto dall'ipossia, sia di STAT3 che di pSTAT3, è consistentemente ridotto

dall'attivazione di ss_{t2} con octreotide, indicando che gli effetti migliorativi dell'octreotide sulle risposte angiogeniche nella retina possono coinvolgere la produzione di STAT3. A tale proposito, un effetto inibitorio dell'octreotide sull'attività di STAT3 è stato riscontrato nelle cellule mieloidi, e comprende l'attivazione della fosfatasi SHP-1 (Oomen et al., 2001), che a sua volta inibisce l'attivazione di STAT3. È interessante notare come SHP-1 sia indicata quale fosfatasi associata all'effetto antiproliferativo di ss_{t2} nelle cellule tumorali (Florio, 2008). L'evidenza sperimentale da noi ottenuta che l'aumento di pSTAT3 indotto dall'ipossia è ulteriormente rafforzato dal blocco di ss_{t2} con CYN, aggiunge ulteriori elementi di prova a sostegno dell'accoppiamento di ss_{t2} con STAT3 nella retina del topo.

Precedenti studi hanno proposto che l'attivazione di STAT3 sia un evento localizzato a valle dell'aumento dell'espressione del VEGF causato dall'ipossia (Mechoulam and Pierce, 2005). I nostri risultati ci portano, invece, a preferire l'ipotesi che l'inibizione dell'angiogenesi indotta dall' ss_{t2} avvenga attraverso l'accoppiamento funzionale di ss_{t2} a STAT3 che, a sua volta, provoca la riduzione dell'espressione del VEGF. La possibilità che l'attivazione di STAT3 sia un evento a monte rispetto all'aumento di espressione del VEGF indotto dall'ipossia, è anche suggerita da risultati ottenuti nelle cellule microvascolari endoteliali dei bovini (Platt et al., 2005), in cui è stato osservato che la cinetica di attivazione di STAT3 è estremamente rapida, e che tale attivazione è in grado di precedere l'incremento dei livelli di VEGF indotto dall'ipossia. Sono necessarie ulteriori indagini per verificare il ruolo di STAT3 nel mediare gli effetti inibitori dell'attivazione di ss_{t2} nell'angiogenesi retinica e sull'espressione di VEGF. Delineare il percorso attraverso il quale STAT3 media l'azione di ss_{t2} nell'angiogenesi retinica può fornire nuovi bersagli farmacologici per la modulazione dell'angiogenesi.

8.5 Conclusioni

Gli analoghi della SRIF con elevata specificità per ssr_2 esercitano effetti antiangiogenici, interferendo con il sistema del VEGF nel modello OIR. Durante questo lavoro di tesi è stato dimostrato che la bassa disponibilità di ossigeno interessa i livelli e la localizzazione di ssr_2 nella retina del topo e che tale effetto potrebbe essere correlato ai livelli alterati della SRIF. Abbiamo anche dimostrato che l'ipossia influenza l'espressione e l'attività di STAT3 e che gli effetti dell'ipossia su STAT3 sono ridotti dall'attivazione di ssr_2 con octreotide. Sugeriamo quindi la possibilità che ssr_2 espressa dai capillari della retina eserciti la sua azione angiointibitoria attraverso la modulazione di VEGF indotta da STAT3. I risultati presenti sostengono ulteriormente la possibilità di utilizzare ligandi selettivi per ssr_2 nel trattamento della retinopatia. Considerando la funzione eminente di STAT3 nella retinopatia, il suo targeting può rappresentare una nuova strategia per un intervento terapeutico.

LETTERATURA CITATA

- Abbott N.J. Revest, PA, Romero, IA. Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1992 18:424–33
- Adamis AP, Miller, J.W., Bernal, M.T., D'Amico, D.J., Folkman, J., Yeo, T.K., Yeo, K.T. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 1994; 118, 445–450.
- Adamis AP, Shima, D.T., Tolentino, M.J., Gragoudas, E.S., Ferrara, N., Folkman, J., D'Amore, P.A., Miller, J.W. Inhibition of vascular endothelial growth factor prevents retinal ischemia-associated iris neovascularization in a nonhuman primate. *Arch. Ophthalmol.* 1996; 114, 66–71.
- Adamis AP, J.W. Miller, M.T. Bernal, D. D'Amico, J. Folkman, T.K. Yeo, K.T. Yeo, Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy, *Am. J. Ophthalmol.* 1994; 118, 445–450.
- Adams RL, Adams IP, Lindow SW, Zhong W, Atkin SL. Somatostatin receptors 2 and 5 are preferentially expressed in proliferating endothelium. *Br J Cancer.* 2005; 92:1493-1498.
- Aiello LP, Avery RL., Arrigg, P.G., Keyt, B.A., Jampel, H.D., Shah, S.T., Pasquale, L.R., Thieme, H., Iwamoto, M.A., Park, J.E. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* 1994a; 331: 1480–1487
- Aiello LP, Robinson, G.S., Lin, Y.W., Nishio, Y., King, G.L. Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display. 1994b; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6231–6235.
- Aiello LP, E.A. Pierce, E.D. Foley, H. Takagi, H. Chen, L. Riddle, N. Ferrara, G.L. King, L.E.H. Smith, Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 1995; 10457– 10461.
- Aiello LP, Northrup, J.M., Keyt BA, Takagi H, Iwamoto MA., Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch. Ophthalmol.* 1995a; 113, 1538–1544.

- Aiello LP, Bursell, S.E., Clermont, A., Duh, E., Ishii, H., Takagi, C., Mori, F., Ciulla, T.A., Ways, K., Jirousek, M., Smith, L.E., King, G.L. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor; *Diabetes* 1997; 46, 1473–1480.
- Aiello LP, Gardner, T.W., King GL, Blankenship G, Cavallerano JD, Ferris FL 3rd, Klein R. et al. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 1998; 21: 143–156.
- Aiello LP, Davis, M.D., Girach A, Kles KA, Milton RC, Sheetz MJ, Vignati L, Zhi XE. PKC-DRS2 Group. Effect of ruboxistaurin on visual loss in patients with diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006; 113, 2221–2230.
- Alexandraki, K., Piperi, C., et al., Inflammatory process in type 2 diabetes: the role of cytokines. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2006; 1084, 89–117.
- Alon T, I. Hemo, A. Itin, J. Pe'er, J. Stone, E. Keshet, Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity, *Nature Med.* 1 (1995) 1024–1028.
- Antonetti, D.A., Barber, A.J., Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, Kester M, Kimball SR, Krady JK, LaNoue KF, Norbury CC, Quinn PG, Sandrasegarane L, Simpson IA; JDRF Diabetic Retinopathy Center Group. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes* 2006; 55, 2401–2411.
- Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Exp Eye Res* 2006; 83:473–483.
- Asahara T, Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967.
- Ashton N, B. Ward, G. Serpell, Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia, *Br. J. Ophthalmol.* 1954; 38: 397–432.
- Ashton N. Retinal vascularization in health and disease. *Am. J. Ophthalmol.* 1957; 44: 7–17.
- Ashton N. The blood–retinal barrier and vaso-glial relationships in retinal disease. *Trans. Ophthalm. Soc. UK* 1965; 85:199–230
- Ashton N. Oxygen and the growth and development of retinal vessels. In vivo and in vitro studies. The XX Francis I. Proctor Lecture, *Am. J. Ophthalmol.* 1966; 62: 412–435.
- Aydede H, Seda Vatansever H, Erhan Y, Ilkgul O. Effects of ocreotide on intestinal mucosa in rats with portal hypertensive enteropathy. *Acta Histochem.* 2009; 111:74–82.

- Aymerich, M.S., Alberdi, E.M., Martinez, A., Becerra, S.P., 2001. Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 42, 3287–3293.
- Bagnoli P, Dal Monte M, Casini G. Expression of neuropeptides and their receptors in the developing retina of mammals. *Histol Histopathol.* 2003; 18:1219-1242.
- Bainbridge JW, Mistry A, Trasher AJ, Ali RR : Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin. Sci.* 2003; 104(6):561-75
- Barber, A.J., Lieth, E., Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J. Clin. Invest.* 1998; 102, 783–791.
- Barber AJ., Antonetti, D.A., Kern TS, Reiter CE, Soans RS, Krady JK, Levison SW, Gardner TW, Bronson SK. The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; 46, 2210–2218.
- Bartoli M, Gu, X., Tsai NT, Venema RC, Brooks SE, Marrero MB, Caldwell RB. Vascular endothelial growth factor activates STAT proteins in aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 33189–33192.
- Bartoli M, Platt D, Lemtalsi T, Gu X, Brooks SE, Marrero MB, Caldwell RB. VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells. *FASEB J.* 2003; 17:1562-1564.
- Bigiani A, Petrucci C, Ghiaroni V, Dal Monte M, Cozzi A, Kreienkamp HJ, Richter D, Bagnoli P. Functional correlates of somatostatin receptor 2 overexpression in the retina of mice with genetic deletion of somatostatin receptor 1. 2004; *Brain Res* 1025:177-185.
- Blaauwgeers HG, Holtkamp, G.M., Rutten, H., Witmer, A.N., Koolwijk, P., Partanen, T.A., Alitalo, K., Kroon, M.E., Kijlstra, A., van Hinsbergh, V.W., Schlingemann, R.O. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 421–428.
- Borras T. Recent developments in ocular gene therapy. *Exp. Eye Res.* 2003; 76 (6): 643 -652.
- Brazeau P, Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., et al., Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 1973; 179, 77–79.
- Breier G, Albrecht, U., Storrer, S., Risau, W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development.* 1992; 114: 521–532.

- Breier G., Albrecht, U., Sterrer, S., Risau, W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development*. 1992; 114: 521–532.
- Bressler NM. Photodynamic therapy of subfoveal choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with verteporfin: two-year results of 2 randomized clinical trials-tap report 2. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:198–207 *Endocrinology* 2002; 146 707–716.
- Broderick, C, Duncan, L, Taylor, N, Dick, AD. IFN-gamma and LPS-mediated IL-10-dependent suppression of retinal microglial activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:2613–22
- Capone A Jr., Diaz-Rohena R, Sternberg P Jr., Mandell B, Lambert HM, Lopez PF Diodelaser photocoagulation for zone 1 threshold retinopathy of prematurity. *Am J Ophthalmol*. 1993; 116:444–450
- Carrasco E, Hernández C, Miralles A, Huguet P, Farrés J, Simó R. Lower somatostatin expression is an early event in diabetic retinopathy and is associated with retinal neurodegeneration. *Diabetes Care*. 2007; 30:2902-2908.
- Casini G, DalMonte M, Petrucci C, Gambellini G, Grouselle D, Allen J, Kreienkamp H, Richter D, Epelbaum J & Bagnoli P. Altered morphology of rod bipolar cell axonal terminals in the retinas of mice carrying genetic deletion of somatostatin subtype receptor 1 or 2. *European Journal of Neuroscience* 2004; 19 43–54
- Casini G, Catalani E, Dal Monte M, Bagnoli P. Functional aspects of the somatostatinergic system in the retina and the potential therapeutic role of somatostatin in retinal disease. *Histol Histopathol* 2005; 20:615-632.
- Catalani E, Cervia D, Martini D, Bagnoli P, Simonetti E, Timperio AM, Casini G. Changes in neuronal response to ischemia in retinas with genetic alterations of somatostatin receptor expression. *Eur J Neurosci*. 2007; 25:1447-1459.
- Cervia D, Bagnoli P. An update on somatostatin receptor signaling in native systems and new insights on their pathophysiology. *Pharmacol Ther* 2007; 116:322-341.
- Cervia D, Casini G, Bagnoli P. Physiology and pathology of somatostatin in the mammalian retina: a current view. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 286:112-122.
- Cervia D, Martini D, Ristori C, Catalani E, Timperio AM, Bagnoli P, Casini G. Modulation of the neuronal response to ischaemia by somatostatin analogues in wild-type and knock-out mouse retinas. *J Neurochem*. 2008;106:2224-2235.

- Chakravarthy, U., Gardiner, T.A. Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. *Prog. Retina Eye Res.* 1999; 18, 511–527.
- Chen Z, Han ZC. STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med Res Rev.* 2008; 28:185-200.
- Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., R. ockl, W., Waltenberger, J., Risau, W. The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271, 17629–17634.
- Cristiani R, Fontanesi G, Casini G, Petrucci C, Viollet C, Bagnoli P. Expression of somatostatin subtype 1 receptor in the rabbit retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41:3191-3199.
- Cristiani R, Petrucci C, Dal Monte M, Bagnoli P. Somatostatin (SRIF) and SRIF receptors in the mouse retina. *Brain Res.* 2002; 936:1-14.
- Cunha-Vaz, J.G. The blood–retinal barriers. *Doc. Ophthalmol* 1976; 41: 287–327
- D’Amore, P.A. Mechanisms of retinal and choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35, 3974–3979.
- Dal Monte M, Petrucci C, Vasilaki A, Cervia D, Grouselle D, Epelbaum J, Kreienkamp HJ, Richter D, Hoyer D, Bagnoli P. Genetic deletion of somatostatin receptor 1 alters somatostatinergic transmission in the mouse retina. *Neuropharmacology* 2003; 45:1080-1092.
- Dal Monte M, Cammalleri M, Martini D, Casini G, Bagnoli P. Antiangiogenic role of somatostatin receptor 2 in a model of hypoxia-induced neovascularization in the retina: results from transgenic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007;48:3480-3489.
- Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M, Bagnoli P. Somatostatin analogs affect retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: involvement of the somatostatin receptor subtype 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:3596-3606.
- Dal Monte M, Ristori C, Cammalleri M, Bagnoli P. Effects of somatostatin analogues on retinal angiogenesis in a mouse model of oxygen-induced retinopathy: involvement of the somatostatin receptor subtype 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50:3596-3606.
- Dawson, D.W., Volpert, O.V., Gillis, P., Crawford, S.E., Xu, H., Benedict, W., Bouck, N.P. Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis. *Science* 1999; 285, 245–248.
- DeNiro M, Alsmadi O, Al-Mohanna F. Modulating the hypoxia-inducible factor signaling pathway as a therapeutic modality to regulate retinal angiogenesis. *Exp Eye Res.* 2009; doi: 10.1016/j.exer.2009.06.013.

- Djonov, V., Schmid, M., Tschanz, S.A., Burri, P.H. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ. Res.* 2000; 86: 286–292.
- Djonov, V., Baum, O., Burri, P.H. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* 2003; 314: 107–117.
- Duh, E., Aiello, L.P. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox. *Diabetes* 1999; 48, 1899–1906.
- Dumont, D.J., Jussila, L., Taipale, J., Lymboussaki, A., Mustonen, T., Pajusola, K., Breitman, M., Alitalo, K. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science* 1998; 282: 946–949.
- Eriksson U., Alitalo, K. Structure, expression and receptorbinding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1999; 237: 41–57.
- Esser S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., Risau, W. Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J. Cell. Biol.* 1998; 140: 947–959.
- Feoktistov I, Ryzhov S, Zhong H, Goldstein AE, Matafonov A, Zeng D, Biaggioni I. Hypoxia modulates adenosine receptors in human endothelial and smooth muscle cells toward an A2B angiogenic phenotype. *Hypertension.* 2004;44:649-654.
- Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L & Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *Journal of Physiology (Paris)* 2000; 94 205–210.
- Ferrara N., Houck, K., Jakeman, L., Leung, D.W. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr. Rev.* 1992; 13: 18–32.
- Ferrara N., Carver-Moore, K., Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380, 439–442.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380:439–442
- Ferrara, N., Chen, H., Davis-Smyth, T., Gerber, H.P., Nguyen, T.N., Peers, D., Chisholm, V., Hillan, K.J., Schwall, R.H. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 1998; 4: 336–340.
- Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 1999; 237: 1–30.

- Ferrara N. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280: C1358-1366.
- Ferrara N Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004; 25:581–611
- Florio T. Somatostatin/somatostatin receptor signalling: phosphotyrosine phosphatases. *Mol Cell Endocrinol.* 2008; 286:40-48.
- Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., Breitman, M.L. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 1995; 376: 66–70.
- Foos R, S. Kopelow, Development of retinal vasculature in paranatal infants, *Surv. Ophthalmol.* 18 1973; 117–127.
- Frank R.N. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 2004; 350, 48–58.
- Gao G., Li, Y., Zhang, D., Gee, S., Crosson, C., Ma, J. Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Lett.* 2001; 489, 270–276.
- Gao G., Li, Y., Gee, S., Dudley, A., Fant, J., Crosson, C., Ma, J.X. Down regulation of vascular endothelial growth factor and up-regulation of pigment epithelium-derived factor: a possible mechanism for the anti-angiogenic activity of plasminogen kringle 5. *J. Biol. Chem.* 2002; 277, 9492–9497.
- Gerber HP., Condorelli, F., Park, J., Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 23659–23667.
- Gerber HP., Dixit, V., Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 13313–13316.
- Gerber HP., Hillan, K.J., Ryan, A.M., Kowalski, J., Keller, G.A., Rangell, L., Wright, B.D., Radtke, F., Aguet, M., Ferrara, N. VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development* 1999; 126, 1149–1159.
- Ghirlanda G, Di Leo, M.A., Caputo S, Cercone S, Greco AV. From functional to microvascular abnormalities in early diabetic retinopathy. *Diabetes Metab. Rev.* 1997; 13, 15–35.
- Gilbert RE, Vranes, D., Berka JL, Kelly DJ, Cox A, Wu LL, Stacker SA, Cooper ME. Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab. Invest.* 1998; 78, 1017–1027.
- Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, et al. HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene.* 2005;24:3110-3120.

- Grouselle D, Winsky-Sommerer R, David JP, Delacourte A, Dournaud P, Epelbaum J. Loss of somatostatin-like immunoreactivity in the frontal cortex of Alzheimer patients carrying the apolipoprotein epsilon 4 allele. *Neurosci Lett*. 1998;255:21-24.
- Guma M, Rius J, Duong-Polk KX, Haddad GG, Lindsey JD, Karin M. Genetic and pharmacological inhibition of JNK ameliorates hypoxia-induced retinopathy through interference with VEGF expression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:8760-8765.
- Hammes HP., Lin, J., Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 1998; 47, 401–406.
- Han Y, Adams, A.J., Bearse MA Jr, Schneek ME. Multifocal electroretinogram and shortwavelength automated perimetry measures in diabetic eyes with little or no retinopathy. *Arch. Ophthalmol*. 2004; 122, 1809–1815.
- Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86 (3): 353 -364.
- Hannon JP, Nunn C, Stolz B, Bruns C, Weckbecker G, Lewis I, Troxler T, Hurth K, Hoyer D. Drug design at peptide receptors: somatostatin receptor ligands. *J Mol Neurosci* 2002; 18:15-27.
- Hayreh SS. The Cilio-Retinal Arteries. *Br. J. Ophthalmol*. 1963; 47: 71–89.
- Hellstrom A, Perruzzi, C., Ju, M., Engstrom, E., Hard, A.L., Liu, J.L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Sjobell, L., LeRoith, D., Senger, D.R., Smith, L.E. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. 2001b; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 5804–5808.
- Hellstrom M, Gerhardt, H., Kalen, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., Betsholtz, C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. 2001a; *J. Cell Biol*. 153, 543–553.
- Henkind, P., De Oliveira, L.F. Development of the retina vessels in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1967; 6: 520–523.
- Hernandez C, Carrasco E, Casamitjana R, Deulofeu R, García-Arumí J, Simó R. Somatostatin molecular variants in the vitreous fluid: a comparative study between diabetic patients with proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic control subjects. *Diabetes Care*. 2005; 28:1941-1947.
- Hernandez C, Simó R. Strategies for blocking angiogenesis in diabetic retinopathy: from basic science to clinical practice. *Expert Opin Investig Drugs*. 2007; 16:1209-1226.

- Higgins MD, Yan Y, Schrier BK. Somatostatin analogs inhibit neonatal retinal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2002;74:553–559.
- Hirai FE., Knudtson, M.D., et al., 2008. Clinically significant macular edema and survival in Type 1 and Type 2 diabetes. *Am. J. Ophthalmol.* 145, 700–706.
- Hiratsuka S, Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1998; 95, 9349–9354.
- Hirschi KK., D'Amore, P.A. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc. Res.* 1996; 32, 687–698.
- Hofland LJ, van Hagen, P. M., & Lamberts, S. W. Functional role of somatostatin receptors in neuroendocrine and immune cells. *Ann Med* 1999; 31(Suppl. 2), 23–27.
- Holz FG, Sheridah, G., Pauleikhoff, D., Bird, A.C. Analysis of lipid deposits extracted from human macular and peripheral Bruch's membrane. *Arch. Ophthalmol.* 1994; 112, 402–406.
- Hogan MJ., Feeney, L. The Ultrastructure of the Retinal Blood Vessels. I. The Large Vessels. *J. Ultrastruct. Res.* 1963; 39:10–28.
- Hornig C., Barleon, B., Ahmad, S., Vuorela, P., Ahmed, A., Weich, H.A. Release and complex formation of soluble VEGFR-1 from endothelial cells and biological fluids. *Lab. Invest.* 2000; 80, 443–454.
- Huang Y, Zhao JJ, Lv YY, Ding PS, Liu RY. Hypoxia down-regulates glucocorticoid receptor alpha and attenuates the anti-inflammatory actions of dexamethasone in human alveolar epithelial A549 cells. *Life Sci.* 2009; 85:107–112.
- Jin KL., Mao, X.O., Greenberg, D.A. Vascular endothelial growth factor: direct neuroprotective effect in in vitro ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2000; 97, 10242–10247.
- Josko J, Mazurek M. Transcription factors having impact on vascular endothelial growth factor (VEGF) gene expression in angiogenesis. *Med Sci Monit* 2004; 10:RA89-RA98.
- Joukov V, Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., Alitalo, K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1996; 15: 290–298.
- Kaipainen A, Korhonen, J., Pajusola, K., Aprelikova, O., Persico, M.G., Terman, B.I., Alitalo, K. The related FLT4, FLT1, and KDR receptor tyrosine kinases show distinct expression patterns in human fetal endothelial cells. 1993; *J. Exp. Med.* 178, 2077–2088.
- Kaipainen, A., Korhonen, J., Mustonen, T., van, H.V., Fang, G.H., Dumont, D., Breitman, M., Alitalo, K. Expression of the fms-like tyrosine kinase 4

- gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development. 1995; *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92, 3566–3570.
- Kaur C, Sivakumar V, Foulds WS, Luu CD, Ling EA. Cellular and vascular changes in the retina of neonatal rats following an acute exposure to hypoxia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; doi:10.1167/iov.09-3552.
- Keshet E, Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia, *J. Neurosci*. 15 1995; 4738–4747.
- Keyt BA, Nguyen, H.V., Berleau, L.T., Duarte, C.M., Park, J., Chen, H., Ferrara, N., 1996. Identification of vascular endothelial growth factor determinants for binding KDR and FLT-1 receptors. Generation of receptor-selective VEGF variants by site-directed mutagenesis. *J Biol. Chem*. 271, 5638–5646.
- Khalid A, Foreman, D., Ahmed, A., Weich, H., Gregor, Z., McLeod, D.S., Boulton, M. Increased expression of placenta growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Lab. Invest*. 1998; 78, 109–116.
- Kiagiadaki F, Thermos K. Effect of intravitreal administration of somatostatin and sst2 analogs on AMPA-induced neurotoxicity in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3080-3089.
- Kim I, Ryan, A.M., Rohan, R., Amano, S., Aguilar, S., Miller, J.W., Adamis, A.P. Constitutive expression of VEGF, VEGFR-1, and VEGFR-2 in normal eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1999; 40, 2115–2121.
- Kim KJ, B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H.S. Phillips, N. Ferrara. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, *Nature* 1993; 362. 841–844.
- Klein R., Klein, B.E., Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch. Ophthalmol*. 1984; 102, 520–526.
- Klein R, Klein, B.E. Diabetic eye disease. *Lancet* 1997; 350, 197–204.
- Klein RJ., Zeiss, C., Chew EY, Tsai JY, Sackler RS, Haynes C, Henning AK, SanGiovanni JP, Mane SM, Mayne ST, Bracken MB, Ferris FL, Ott J, Barnstable C, Hoh J. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005; 308, 385–389.
- Kliffen M., Sharma, H.S., Mooy, C.M., Kerkvliet, S., de Jong, P.T. Increased expression of angiogenic growth factors in age-related maculopathy. *Br. J. Ophthalmol*. 1997; 81, 154–162.
- Klisovic DD, O'Dorisio, M. S., Katz, S. E., Sall, J. W., Balster, D., O'Dorisio, T. M., Craig, E., & Lubow, M. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42, 2193–2201.

- Klisovic DD, O'Dorisio MS, Katz SE, Katz SE, Sall JW, Balster D, O'Dorisio TM, Craig E, Lubow M. Somatostatin receptor gene expression in human ocular tissues: RT-PCR and immunohistochemical study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:2193-2201.
- Korte GE, Reppucci, V., Henkind, P. RPE destruction causes choriocapillary atrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1984;25: 1135–1145.
- Krantic S. Peptides as regulators of the immune system: emphasis on somatostatin. *Peptides* 2000; 21 1941–1964.
- Kroll J, Waltenberger, J. A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochem Bioph. Res. Commun*. 1999; 265, 636–639.
- Kukk E, Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., Alitalo, K. VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development* 1996; 122: 3829–3837.
- Kvanta A, Algvere, P.V., Berglin, L., Seregard, S. Subfoveal fibrovascular membranes in age-related macular degeneration express vascular endothelial growth factor. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 1996; 37, 1929–1934.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685.
- Lahdenranta J, Pasqualini, R., Schlingemann, R.O., Hagedorn, M., Stallcup, W.B., Bucana, C.D., Sidman, R.L., Arap, W. An anti-angiogenic state in mice and humans with retinal photoreceptor cell degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2001; 98, 10368–10373.
- Lambooij AC, Kuijpers, R. W., van Lichtenauer-Kaligis, E. G., Kliffen, M., Baarsma, G. S., van Hagen, P. M., & Mooy, C. M. Somatostatin receptor 2A expression in choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41, 2329– 2335.
- Lewin, M. J. The somatostatin receptor in the GI tract. *Annu Rev Physiol* 1992; 54, 455– 468.
- Liggett PE, Lavaque AJ, Jablon EP, Reichel E, Quiroz- Mercado H Transpupillary thermotherapy for the treatment of choiroidal neovascularization associated with agerelated macular degeneration. *Age-related Macular Degeneration: A comprehensive Textook*. Lippincott Williams and Wilkin, Philadelphia. 2006; 214–230
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25:402-408.
- Lopez PF, Sippy, B.D., Lambert, H.M., Thach, A.B., Hinton, D.R. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for

- vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996; 37, 855–868.
- Luttun A, Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., DeKlerck, B., Compennolle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J.M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H.F., Carmeliet, P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nature Med.* 2002; 8, 831–840.
- Mastrodimitou N, Vasilaki A, Papadioti A, Low MJ, Hoyer D, Thermos K. Somatostatin receptors in wildtype and somatostatin deficient mice and their involvement in nitric oxide physiology in the retina. *Neuropeptides.* 2006;40:365-373.
- McLeod D, S. Crone, G. Luty, Vasoproliferation in the neonatal dog model of oxygen-induced retinopathy, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996; 37. 1322–1333.
- Mechoulam H, Pierce EA. Expression and activation of STAT3 in ischemia-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:4409-4416.
- Mejias M, Garcia-Pras E, Tiani C, Bosch J, Fernandez M. The somatostatin analogue octreotide inhibits angiogenesis in the earliest, but not in advanced, stages of portal hypertension in rats. *J Cell Mol Med.* 2008; 12:1690-1699.
- Melmed S, Vance, M. L., Barkan, A. L., Bengtsson, B. A., Kleinberg, D., Klibanski, A., & Trainer, P. J. Current status and future opportunities for controlling acromegaly. *Pituitary* 2002; 5, 185– 196.
- Meyer M, Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H.J., Dehio, C. A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF- E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 1999; 18, 363–374.
- Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina with some observation for its significance for certain retinal diseases. *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* 1948; 68, 137–186.
- Miller JW, Adamis, A.P., Aiello, L.P. Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Metabol. Rev.* 1997; 13, 37–50.
- Monacci WT, Merrill, M.J., Oldfield, E.H. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *Am. J. Physiol.* 1993; 264: C995–1002.

- Moyse E, Beaudet A, Bertherat J, Epelbaum J. Light microscopic radioautographic localization of somatostatin binding sites in the brainstem of the rat. *J Chem Neuroanat.* 1992; 5:75-84.
- Msaouel P, Galanis E, Koutsilieris M. Somatostatin and somatostatin receptors: implications for neoplastic growth and cancer biology. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18:1297-1316
- Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002; 21:2000-2008.
- Noman MZ, Buart S, Van Pelt J, Richon C, Hasmim M, Leleu N, Suchorska WM, Jalil A, Lecluse Y, El Hage F, Giuliani M, Pichon C, Azzarone B, Mazure N, Romero P, Mami-Chouaib F, Chouaib S. The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis. *J Immunol.* 2009; 182:3510-3521.
- Nunn C, Schoeffer P, Langenegger D, Hoyer D. Functional characterisation of the putative somatostatin sst₂ receptor antagonist CYN 154806. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2003; 367:1-9.
- Ogata N, Wang, L., Jo, N., Tombran-Tink, J., Takahashi, K., Mrazek, D., Matsumura, M. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr. Eye Res.* 2001a; 22, 245–252.
- Ogata N, Tombran-Tink, J., Jo, N., Mrazek, D., Matsumura, M. Upregulation of pigment epithelium-derived factor after laser photocoagulation. *Am. J. Ophthalmol.* 2001b; 132, 427–429.
- Ogata N, Wada, M., Otsuji, T., Jo, N., Tombran-Tink, J., Matsumura, M. Expression of pigment epithelium-derived factor in normal adult rat eye and experimental choroidal neovascularization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2002; 43, 1168–1175.
- Olias G, Viollet C, Kusserow H, Epelbaum J, Meyerhof W. Regulation and function of somatostatin receptors. *J Neurochem.* 2004; 89:1057-1091.
- Olofsson B, Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K., Eriksson, U. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1996; 93: 2576– 2581.
- Oomen SP, Ward AC, Hofland LJ, Lamberts SW, Löwenberg B, Touw IP. Somatostatin modulates G-CSF-induced but not interleukin-3-induced proliferative responses in myeloid 32D cells via activation of somatostatin receptor subtype 2. *Hematol J.* 2001; 2:322-329.
- Ozawa Y, Nakao K, Kurihara T, Shimazaki T, Shimmura S, Ishida S, Yoshimura A, Tsubota K, Okano H. Roles of STAT3/SOCS3 pathway in regulating

- the visual function and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of rhodopsin during retinal inflammation. *J Biol Chem* 2008; 283:24561-24570.
- Paavonen K, Puolakkainen, P., Jussila, L., Jahkola, T., Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor receptor-3 in lymphangiogenesis in wound healing. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1499–1504.
- Palii SS, Caballero S Jr, Shapiro G, Grant MB. Medical treatment of diabetic retinopathy with somatostatin analogues. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 17:73-82.
- Palii SS, Afzal A, Shaw LC, Pan H, Caballero S, Miller RC, Jurczyk S, Reubi JC, Tan Y, Hochhaus G, Edelhauser H, Geroski D, Shapiro G, Grant MB. Nonpeptide somatostatin receptor agonists specifically target ocular neovascularization via the somatostatin type 2 receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:5094–5102.
- Paques M, Massin, P., Gaudric, A. Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes Metab.* 1997; 23, 125–130.
- Paques M, Boval, B., Richard, S., Tadayoni, R., Massin, P., Mundler, O., Gaudric, A., Vicaud, E. Evaluation of fluorescein-labeled autologous leukocytes for examination of retinal circulation in humans. *Curr. Eye Res.* 2000; 21, 560–565.
- Partanen TA., Alitalo, K., Miettinen, M. Lack of lymphatic vascular specificity of vascular endothelial growth factor 3 in 185 vascular tumors. *Cancer* 1999; 86, 2406–2412.
- Partanen TA., Arola, J., Saaristo, A., Jussila, L., Ora, A., Miettinen, M., Stacker, S.A., Achen, M.G., Alitalo, K. VEGF-C and VEGF-D expression in neuroendocrine cells and their receptor, VEGFR-3, in fenestrated blood vessels in human tissues. *FASEB J.* 2000; 14, 2087–2096.
- Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat. Res.* 2004;117: 3–32.
- Patel YC. Somatostatin and its receptor family. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1999; 20 157–198.
- Pattyn F, Speleman F, De Paepe A, Vandesompele J. RTPPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31:122-123.
- Pavan B, Fiorini S, Dal Monte M, Lunghi L, Biondi C, Bagnoli P, Cervia D. Somatostatin coupling to adenylyl cyclase activity in the mouse retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 370:91-98.
- Peichev M., Moore, A., Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood.* 2000; 95: 952–958

- Penn JS, B.L. Tolman, M.M. Henry, Oxygen-induced retinopathy in the rat: Relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 1994; 3429– 3435.
- Penn J.S., A. Madan, R.B. Caldwell, M. Bartoli, R.W. Caldwell, M.E. Hartnett. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research* 2008; 27:331– 371
- Phng LK, Potente M, Leslie JD, Babbage J, Nyqvist D, Lobov I, Ondr JK, Rao S, Lang RA, Thurston G, Gerhardt H. Nrp coordinates endothelial Notch and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev Cell.* 2009; 16:70-82.
- Pierce EA, R.L. Avery, E.D. Foley, L.P. Aiello, L.E. Smith, Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 1995; 905–909.
- Pierce EA, E.D. Foley, L.E. Smith, Regulation of vascular endothelial growth factor by oxygen in a model of retinopathy of prematurity. *Arch. Ophthalmol.* 114 1996; 1219–1228.
- Plate KH, G. Breier, H.A. Weich, W. Risau, Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo, *Nature* 359 1992; 845–848.
- Platt DH, Bartoli M, El-Remessy AB et al. Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells via STAT3. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39:1353-1361.
- Poulsen JE, Simmon's disease with resolution of proliferative diabetic retinopathy, *Diabetes* 2, 1953.
- Provis JM. Development of the Primate Retinal Vasculature. *Prog. Retina Eye Res.* 2001; 20, 799–821.
- Provis JM., Leech, J., Diaz, C.M., Penfold, P.L., Stone, J., Keshet, E. Development of the human retinal vasculature: cellular relations and VEGF expression. *Exp. Eye Res.* 1997; 65, 555–568.
- Qaum T, Xu, Q.; Joussen, A.M.; Clemens, M.W.; Qin, W.; Miyamoto, K.; Hassessian, H.; Wiegand, S.J.; Rudge, J.; Yancopoulos, G.D. and Adamis, A.P. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; 42: 2408-2413.
- Qu Y, Zhang S, Xu X, Wang H, Li J, Zhou F, Wei F. Octreotide inhibits choroidal neovascularization in rats. *Ophthalmic Res.* 2009;42:36-42.
- Reich SJ, Bennett J: Gene therapy for ocular neovascularization: a cure in sight. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2003;13 (3): 317 -322.
- Reichenbach A., Wurm, A., Pannicke, T., Iandiev, I., Wiedemann, P., Bringmann, A.. Muller cells as players in retinal degeneration and edema. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol* 2007; 245: 627–636.
- Reichlin S. Somatostatin. *N Engl J Med* 1983; 309, 1495– 1501.

- Regnault TR., Orbus, R.J., de Vrijer, B., Davidsen, M.L., Galan, H.L., Wilkening, R.B., Anthony, R.V. Placental expression of VEGF, PlGF and their receptors in a model of placental insufficiency-intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* 2002; 3, 132–144.
- Resnikoff S., Pascolini, D., Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, Mariotti SP. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bull. World Health Org.* 2004 82, 844–851.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:73–91
- Robinson GS, E.A. Pierce, S.L. Rook, E. Foley, R. Webb, L.E. Smith, Oligodeoxynucleotides inhibit retinal neovascularization in a murine model of proliferative retinopathy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 1996; 4851–4856.
- Robinson GS., Ju, M., Shih, S.C., Xu, X., McMahon, G., Caldwell, R.B., Smith, L.E. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *FASEB J.* 2001; 15, 1215–1217
- Roth AM, Retinal vascular development in premature infants, *Am. J. Ophthalmol.* 84 1977; 636–640.
- Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol.* 2000;132:365-386.
- Ruiter DJ., Schlingemann, R.O., Westphal, J.R., Denijn, M., Rietveld, F.J., De Waal, R.M. Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. *Behring Inst. Mitt.* 1993; 258–272.
- Rungger-Brandle E., Messerli, J.M., Niemeyer, G., Eppenberger, H.M. Confocal microscopy and computer-assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.* 1993; 5:1093–1106.
- Saaristo A., Partanen, T.A., Arola, J., Jussila, L., Hytonen, M., Makitie, A., Vento, S., Kaipainen, A., Malmberg, H., Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor-C and its receptor VEGFR-3 in the nasal mucosa and in nasopharyngeal tumors. *Am. J. Pathol.* 2000; 157, 7–14.
- Schaefer LK, Ren Z, Fuller GN, Schaefer TS. Constitutive activation of Stat3alpha in brain tumors: localization to tumor endothelial cells and activation by the endothelial tyrosine kinase receptor (VEGFR-2). *Oncogene.* 2002;21:2058-2065.
- Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45:195–214
- Schulz S., Handel, M., Schreff, M., Schmidt, H., & Holtt, V. Localisation of five somatostatin receptors in the rat central nervous system using subtype-specific antibodies. *J. Physiol (Paris)* 2000; 94, 259–264.
- Schwesinger C., Yee, C., Rohan, R.M., Joussen, A.M., Fernandez, A., Meyer, T.N., Poulaki, V., Ma, J.J., Redmond, T.M., Liu, S., Adamis, A.P.,

- D'Amato, R.J. Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *Am. J. Pathol.* 2001; 158, 1161–1172.
- Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:721–732.
- Shakib M., Cunha-Vaz, J.G. Studies on the permeability of the blood–retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role on their permeability. *Exp. Eye Res.* 1966; 5:229–234.
- Shalaby F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gertsenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., Schuh, A.C. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 1995; 376: 62–66.
- Shen BQ., Lee, D.Y., Zioncheck, T.F. Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 33057–33063.
- Shen BQ., Lee, D.Y., Gerber, H.P., Keyt, B.A., Ferrara, N., Zioncheck, T.F. Homologous up-regulation of KDR/Flk-1 receptor expression by vascular endothelial growth factor in vitro. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 29979–29985.
- Shifren JL., Doldi, N., Ferrara, N., Mesiano, S., Jaffe, R.B. In the human fetus, vascular endothelial growth factor is expressed in epithelial cells and myocytes, but not vascular endothelium: implications for mode of action. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79: 316–322.
- Shinoda K., Ishida, S., Kawashima, S., Wakabayashi, T., Matsuzaki, T., Takayama, M., Shinmura, K., Yamada, M. Comparison of the levels of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in aqueous fluid and serum with grades of retinopathy in patients with diabetes mellitus. *Br. J. Ophthalmol.* 1999; 83, 834–837.
- Shinoda K., Ishida, S., Kawashima, S., Wakabayashi, T., Uchita, M., Matsuzaki, T., Takayama, M., Shinmura, K., Yamada, M. Clinical factors related to the aqueous levels of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Eye Res.* 2000; 21, 655–661.
- Shweiki D, A. Itin, D. Soffer, E. Keshet, Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis, *Nature* 1992; 359. 843–845.
- Siehler S, Seuwen K, Hoyer D. Characterisation of human recombinant somatostatin receptors. 1. Radioligand binding studies. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1999;360:488-499.
- Simó R, Lecube A, Sararols L, et al. Deficit of somatostatin-like immunoreactivity in the vitreous fluid of diabetic patients: possible role in

- the development of proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Care*. 2002;25:2282-2286.
- Simo R, Carrasco M, Garcia-Ramirez M, Hernández C: Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr. Diabet. Rev.* 2006; 2 : 71 -98
- Sjølie AK, Stephenson J, Aldington S, Kohner E, Janka H, Stevens L, Fuller J. Retinopathy and vision loss in insulindependent diabetes in Europe. The EURODIAB IDDM Complications Study. *Ophthalmology*. 1997; 104, 252–260.
- Smith G., McLeod, D., Foreman, D., Boulton, M. Immunolocalisation of the VEGF receptors FLT-1, KDR, and FLT-4 in diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 1999; 83, 486–494.
- Smith LE, E. Wesolowski, A. McLellan, S.K. Kostyk, R. D’Amato, R. Sullivan, P.A. D’Amore, Oxygen-induced retinopathy in the mouse, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1994; 35. 101– 111.
- Smith LE, J.J. Kopchick, W. Chen, J. Knapp, F. Kinose, D. Daley, E. Foley, R.G. Smith, J.M. Schaeffer, Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization, *Science* 1997; 276. 1706–1709.
- Smith LE, W. Shen, C. Perruzzi, S. Soker, F. Kinose, X. Xu, G. Robinson, S. Driver, J. Bischoff, B. Zhang, J.M. Schaeffer, D.R. Senger, Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor, *Nature Med.* 1999; 5. 1390–1395.
- Spilisbury K., Garrett, K.L., Shen, W.Y., Constable, I.J., Rakoczy, P.E. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2000; 157, 135–144.
- Spranger J, Hammes, H.P., Preissner, K.T., Schatz, H., Pfeiffer, A.F. Release of the angiogenesis inhibitor angiostatin in patients with proliferative diabetic retinopathy: association with retinal photocoagulation. *Diabetologia* 2000; 43, 1404–1407.
- Stellmach V, Crawford, S.E., Zhou, W., Bouck, N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2001; 98, 2593–2597.
- Stone J, A. Itin, T. Alon, J. Pe’er, H. Gnessin, T. Chan-Ling, P.S. Sharp, T.J. Fallon, O.J. Brazier, L. Sandler, G.F. Joplin, E.M. Kohner, Long-term follow-up of patients who underwent yttrium-90 pituitary implantation for treatment of proliferative diabetic retinopathy, *Diabetologia* 1987; 30. 199–207.
- Stone J, Chan-Ling, T., Pe’er, J., Itin, A., Gnessin, H., Keshet, E. Roles of vascular endothelial growth factor and astrocyte degeneration in the

- genesis of retinopathy of prematurity. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1996; 37, 290–299.
- Takeda M.; Mori, F.; Yoshida, A.; Takamiya, A.; Nakagomi, S.; Sato, E. and Kiyama, H. *Diabetologia*. 2001; 44: 1043-1050.
- Tannenbaum GS & Epelbaum J. Somatostatin In: *Handbook of Physiology*. Vol V, Section 7: The Endocrine System, Hormonal Control of Growth. (J.L. Kostyo, Vol. Ed., H.M. Goodman, Section Ed.). Oxford University Press, NY, Oxford, 2000; 221–265.
- Terris B., Scoazec, J.Y., Rubbia, L., Bregeaud, L., Pepper, M.S., Ruzniewski, P., Belghiti, J., Flejou, J., Degott, C. Expression of vascular endothelial growth factor in digestive neuroendocrine tumours. *Histopathology* 1998; 32: 133–138.
- Thakker G.D., Hajjar, D.P., Muller, W.A., Rosengart, T.K. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 10002–10007.
- Thermos K, Bagnoli P, Epelbaum J, Hoyer D. The somatostatin sst1 receptor: an autoreceptor for somatostatin in brain and retina? *Pharmacol Ther.* 2006;110:455-464.
- Thieme H., Aiello, L.P., Takagi, H., Ferrara, N., King, G.L. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes* 1995; 44, 98–103.
- Ueki Y, Wang J, Chollangi S, Ash JD. STAT3 activation in photoreceptors by leukemia inhibitory factor is associated with protection from light damage. *J Neurochem* 2008;105:784-796.
- van Hagen PM, Baarsma GS, Mooy CM, Ercoskan EM, ter Averst E, Hofland LJ, Lamberts SW, Kuijpers RW. Somatostatin and somatostatin receptors in retinal diseases. *Eur J Endocrinol.* 2000;143 Suppl 1:S43-51.
- Valtola R., Salven, P., Heikkilä, P., Taipale, J., Joensuu, H., Rehn, M., Pihlajaniemi, T., Weich, H., De Waal, R.M., Alitalo, K. VEGFR-3 and its ligand VEGF-C are associated with angiogenesis in breast cancer. *Am. J. Pathol.* 1999; 154, 1381–19291390.
- Vuorela P., Helse, S., Hornig, C., Alitalo, K., Weich, H., Halmesmaki, E. Amniotic fluid-soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* 2000; 95, 353–357.
- Waltenberger J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., Heldin, C.H. Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* 1994; 269, 26988–26995.
- Waltenberger J., Mayr, U., Pentz, S., Hombach, V. Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 1996; 94, 1647–1654.

- Watson JC, Balster DA, Gebhardt BM, O'Dorisio TM, O'Dorisio MS, Espenan GD, Drouant GJ, Woltering EA. Growing vascular endothelial cells express somatostatin subtype 2 receptors. *Br J Cancer*. 2001;85:266-272.
- Weckbecker G, Lewis I, Albert R, Schmid HA, Hoyer D, Bruns C. Opportunities in somatostatin research: biological, chemical and therapeutic aspects. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:999-1017.
- Wells JA., Murthy, R., Chibber, R., Nunn, A., Molinatti, P.A., Kohner, E.M., Gregor, Z.J. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol*. 1996a; 80, 363–366.
- Wells JA., Murthy, R., Chibber, R., Nunn, A., Molinatti, P.A., Kohner, E.M., Gregor, Z.J. Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. *Br. J. Ophthalmol*. 1996b; 80, 363–366.
- Wilkinson-Berka JL, Lofthouse S, Jaworski K, Ninkovic S, Tachas G, Wraight CJ. An antisense oligonucleotide targeting the growth hormone receptor inhibits neovascularization in a mouse model of retinopathy. *Mol Vis*. 2007;13:1529–1538.
- Wise GN., Dollery, C.T., Henkind, P. *The Retinal Circulation*. Harper and Row, New York 1975; 20–82.
- Witmer AN., Van Blijswijk, B.C., Hofman, P., Dai, J., Partanen, T.A., Vrensen, G.F.J.M., Schlingemann, R.O. VEGFR-3 in adult angiogenesis. *J. Pathol*. 2001; 195, 490–497.
- Witmer AN., Blaauwgeers, H.G., Weich, H.A., Alitalo, K., Vrensen, G.F.J.M., Schlingemann, R.O. Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in experimental VEGF-induced retinopathy in monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2002a; 43, 849–857.
- Witmer AN., Dai, J., Weich, H.A., Vrensen, G.F., Schlingemann, R.O. Expression of vascular endothelial growth factor receptors 1, 2, and 3 in quiescent endothelia. *J. Histochem. Cytochem*. 2002b; 50, 767–778
- Witmer AN., G.F.J.M. Vrensen, C.J.F. Van Noorden, R.O. Schlingemann. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2003; 22:1–29
- Wright AD, E.M. Kohner, N.W. Oakley, M. Hartog, G.F. Joplin, T.R. Fraser, Serum growth hormone levels and the response of diabetic retinopathy to pituitary ablation, *Br. Med. J*. 1969; 2. 346–348.
- Yi X., Mai, L.C., Uyama, M., Yew, D.T. Time-course expression of vascular endothelial growth factor as related to the development of the retinochoroidal vasculature in rats. *Exp. Brain Res*. 1998; 118, 155–160.

- Zachary I., Gliki, G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc. Res.* 2001; 49, 568–581.
- Zammaretti P, Zisch AH. Adult ‘endothelial progenitor cells’. Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37:493–503
- Zhang C, Li H, Liu MG, Kawasaki A, Fu XY, Barnstable CJ, Shao-Min Zhang S. STAT3 activation protects retinal ganglion cell layer neurons in response to stress. *Exp Eye Res* 2008; 86:991-997.
- Zhang HR. Scanning electron-microscopic study of corrosion casts on retinal and choroidal angioarchitecture in man and animals. *Prog Ret Eye Res.* 1994;13:243-270.
- Zhang Y., Stone, J. Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1997; 38:1653–1666
- Zhu M, Li MW, Tian XS, Ou XM, Zhu CQ, Guo JC. Neuroprotective role of delta-opioid receptors against mitochondrial respiratory chain injury. *Brain Res.* 2009;1252:183-191.